

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Analyse des therapeutischen Potentials zweier  
Antikörper zur Anwendung in der Tumorthherapie**



Bettina Carolin Freiin von Neubeck

2017





Dissertation eingereicht am 09.08.2017

Erstgutachter: PD Dr. Josef Mautner

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.17

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst wurde. Dabei wurden keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde weder in der jetzigen, noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 09.08.2017

---

Bettina von Neubeck

„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung“

(Charles Darwin)

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Abstract .....	2
3	Einleitung.....	3
3.1	Entstehung von Krebs / Karzinogenese.....	3
3.2	Das Tumormikromilieu .....	5
3.2.1	Hypoxie und Azidose in der Tumormikroumgebung.....	5
3.2.2	Die Rolle der Carboanhydrasen in der Tumorprogression .....	7
3.2.2.1	Carboanhydrase IX (CAIX) .....	7
3.2.2.2	Carboanhydrase XII (CAXII) .....	8
3.2.2.3	Carboanhydrase XII und Chemoresistenz von Tumorzellen .....	9
3.2.3	Immunevasion von Tumorzellen .....	10
3.2.3.1	CD73 und Adenosin im extrazellulären Tumormilieu .....	12
3.3	Extrazelluläre Vesikel.....	16
3.4	Antikörper in der Krebsimmuntherapie.....	18
3.4.1	Wirkung therapeutischer Antikörper .....	19
3.5	Ziele dieser Arbeit.....	21
4	Material.....	22
4.1	Geräte .....	22
4.2	Puffer und Lösungen.....	23
4.3	Versuchstiere .....	26
4.4	Antikörper .....	26
4.5	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	27
4.6	Chemikalien und Reagenzien.....	28
4.7	Plasmide .....	29
4.8	Kits.....	29
4.9	Software .....	29

4.10	Zelllinien.....	30
4.11	Medien und Zusätze.....	31
5	Methoden.....	32
5.1	Proteinbiochemische Methoden.....	32
5.1.1	Herstellen von Zelllysaten.....	32
5.1.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	32
5.1.2.1	Bradford-Assay .....	32
5.1.2.2	BCA-Assay .....	32
5.1.3	Bis/Tris-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Immunoblotting .....	33
5.1.3.1	Dot Blot.....	33
5.1.4	Immunpräzipitation (IP) zur Identifikation der Spezifität primärer Hybridomüberstände.....	34
5.1.5	Bestimmung der CD73-Aktivität von löslichem, humanem CD73.....	35
5.2	Zellbiologische Methoden.....	35
5.2.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	35
5.2.2	Passagieren adhärenter Zellen.....	36
5.2.3	Passagieren semiadhärenter GBM-Linien.....	36
5.2.4	Bestimmung der Zellzahl .....	36
5.2.5	Kultivierung von Zellen als <i>hanging drop</i> -Sphäroidkulturen .....	37
5.2.6	Stabile Transfektion von Zellen.....	37
5.2.7	Durchflusszytometrie.....	37
5.2.8	Isolierung von extrazellulären Vesikeln (EV) aus GBM20-Kulturüberstand und humanem Aszites .....	38
5.2.8.1	Dichtegradient zur Konzentration und Charakterisierung von EV .....	38
5.2.8.2	Bestimmung der Partikelanzahl mittels „ <i>Nanopartikel-Tracking-Analyse</i> “ (NTA).....	39
5.2.9	Viabilitätsassay (MTT).....	39

5.2.10	Zytotoxizitätsassay (LDH-Assay).....	40
5.2.11	Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Chemotherapeutika...	40
5.2.12	P-Glykoprotein-Aktivitätsassay .....	41
5.2.13	Bestimmung der CD73-Aktivität auf Zellen .....	42
5.2.13.1	Bestimmung der Phosphatkonzentration .....	42
5.2.13.2	Bestimmung der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentration.....	43
5.3	Immunhistologie .....	43
5.3.1	Anfertigen von Kryoschnitten aus präparierten murinen Gehirnen.....	43
5.3.1.1	H&E-Färbung von Kryoschnitten.....	43
5.3.1.2	Immunfärbungen von Kryoschnitten.....	44
5.4	Tierexperimentelles Arbeiten.....	44
5.4.1	Immunisierung von Ratten und Generierung von Hybridomen .....	44
5.4.2	Biolumineszenzbasierte Bildgebung .....	45
5.4.3	Hochauflösende Ganzkörpermikroskopie von Mäusen .....	45
5.5	Statistik.....	46
6	Ergebnisse CAXII und 6A10.....	47
6.1	Analyse des additiven, antitumoralen Effekts von 6A10 und MSC-8 .....	47
6.2	Einfluss von 6A10 auf Chemoresistenz <i>in vitro</i> .....	52
6.3	Entwicklung eines orthotopen Brustkrebsmodells zur Untersuchung des Einflusses von 6A10 auf die Chemoresistenz <i>in vivo</i> .....	54
6.4	Effekt von 6A10 auf Glioblastoma multiforme <i>in vivo</i> .....	62
7	Ergebnisse CD73 und 22E6.....	66
7.1	Isolierung von GBM20 EV für die Immunisierung.....	66
7.2	Charakterisierung primärer Hybridomüberstände und Analyse der Antikörperspezifität.....	67
7.2.1	Der Antikörper 22E6 bindet humanes CD73 .....	67
7.3	Untersuchung des Effekts von 22E6 auf die CD73-Enzymaktivität .....	68

7.3.1	Analyse der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentration.....	71
7.3.2	Effekt von 22E6 auf lösliches rekombinantes CD73 .....	72
7.4	Inhibierung von CD73 auf Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) durch 22E6.....	74
7.5	Nachweis von CD73 auf GBM20 EV .....	77
7.5.1	Aktivitätsbestimmung von CD73 auf GBM20 EV .....	78
7.6	CD73-Aktivität auf EV isoliert aus humaner Aszites .....	80
8	Diskussion .....	84
8.1	Carboanhydrase IX- und XII-Inhibitoren in der Tumorthherapie .....	84
8.2	Sensitivierung chemoresistenter Mammakarzinomzellen gegenüber Anthrazyklinen durch 6A10 .....	86
8.3	6A10 reduziert das Tumorwachstum in einem orthotopen Glioblastommodell ..	89
8.4	Inhibition von CD73 in der Tumorthherapie.....	90
8.4.1	Der Antikörper 22E6 inhibiert die CD73-Enzymaktivität auf Tumorzellen ..	92
8.4.2	Inhibierung von CD73 durch 22E6 auf Tumor-EV .....	93
8.4.3	22E6 blockiert kein lösliches CD73.....	94
8.5	Limitationen und Schwierigkeiten der Antikörpertherapie .....	95
9	Anhang .....	I
9.1	Literaturverzeichnis .....	I
9.2	Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
9.3	Danksagung .....	XV

## 1 Zusammenfassung

Krebs entsteht durch eine Ansammlung von Mutationen, die zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Die Interaktion von Tumorzellen mit tumorinfiltrierenden Zellen und dem Tumormikromilieu tragen dabei entscheidend zur Progression der malignen Erkrankung bei. Die konventionelle Chemotherapie stößt besonders bei der Behandlung von chemoresistenten Tumoren an ihre therapeutischen Grenzen und geht meist mit starken Nebenwirkungen einher. Daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze dringend notwendig. In der Immuntherapie werden unter anderem monoklonale Antikörper eingesetzt, welche tumorassoziierte Antigene binden, um zielgerichtet Tumorzellen anzugreifen. Mittlerweile sind mehrere therapeutische Antikörper für die Tumorbehandlung zugelassen und zeigen gute Therapieerfolge.

In der vorliegenden Arbeit wird das therapeutische Potential der Antikörper 6A10 und 22E6 untersucht. Beide Antikörper wurden durch eine Immunisierung von Ratten mit extrazellulären Vesikeln (EV) von Tumorzellen generiert. Ziel der Arbeit war es, die Wirkung beider Antikörper in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Modellen zu charakterisieren und die Wirksamkeit für die Tumorthherapie zu untersuchen.

Der Antikörper 6A10 bindet und inhibiert die tumorassoziierte Carboanhydrase XII und hatte in vorangegangenen Versuchen bereits antitumorale Effekte gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die therapeutische Effizienz von 6A10 in weiteren präklinischen Modellen analysiert. In einem orthotopen Glioblastommodell führte eine Behandlung mit 6A10 zu einem verringerten Tumolvolumen und zu einer reduzierten Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe. Zusätzlich bewirkte 6A10 eine Sensitivierung chemoresistenter Brustkrebszellen gegenüber Anthrazyklinen. Dabei resultierte die kombinierte Applikation von 6A10 und Doxorubicin in einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Lungenmetastasen in einem orthotopen Brustkrebsmodell.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der anti-CD73 Antikörper 22E6 etabliert. 22E6 inhibiert CD73 auf Tumorzellen, was in einer Sensitivierung von chronisch lymphatischen Leukämie-Zellen (CLL-Zellen) gegenüber Etoposid resultierte.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das therapeutische Potential der Antikörper 6A10 und 22E6 aufgezeigt werden. Beide Antikörper bieten eine Möglichkeit für den Einsatz in der Tumorthherapie.



## 2 Abstract

Cancer results from an accumulation of mutations in a cell that lead to uncontrolled proliferation. The progression of a malignant disease is crucially influenced by interactions between tumor cells and tumor-infiltrating cells as well as the tumor microenvironment. Since the efficacy of conventional chemotherapies is often limited due to chemoresistant tumor cells or serious adverse effects, novel therapeutic strategies are urgently needed. Immunotherapeutic approaches use monoclonal antibodies to specifically target tumor-associated antigens on tumor cells. To date, several therapeutic antibodies show promising clinical results.

In this work, two antibodies were investigated which both originated from an immunization of rats with tumor cell derived extracellular vesicles (EVs). The aim of this work was to analyze both antibodies in preclinical *in vitro* and *in vivo* experiments for a potential clinical application in tumor therapy.

Antibody 6A10 binds and inhibits the tumor associated carbonic anhydrase XII and showed anti-tumor effects in previous experiments. In the present study, therapeutic efficacy of 6A10 was assessed in different models. The treatment of glioblastoma with 6A10 in an orthotopic mouse model led to a reduction in tumor volume and invasion of tumor cells into surrounding tissue. Furthermore, the application of 6A10 caused sensitization of chemoresistant breast cancer cells to anthracyclines. The combined therapy of 6A10 and Doxorubicin resulted in a significant reduction of the number of lung metastases in an orthotopic breast cancer model.

In addition, an anti-CD73 antibody (22E6) was established in this work. 22E6 inhibits CD73 on tumor cells thereby sensitizing CLL-cells to Etoposide treatment.

In conclusion, therapeutic efficacy of the antibodies 6A10 and 22E6 was demonstrated. They may both provide benefits for cancer therapy.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Entstehung von Krebs / Karzinogenese

Krebs ist eine komplexe Krankheit, die durch unterschiedlichste genetische Veränderungen entsteht. Dabei werden verschiedene Erkrankungen unter einem Begriff zusammengefasst, die jedoch alle eines gemeinsam haben: Unkontrolliertes Wachstum maligner Zellen, welche aus ehemals gesunden Körperzellen hervorgegangen sind. In Deutschland erkrankten im Jahr 2013 rund 533.000 Menschen an Krebs. Bei Frauen zählen Brust-, Darm- und Lungenkrebs, bei Männern Prostata-, Darm- und Lungenkrebs zu den häufigsten malignen Erkrankungen [1].

Die genauen Ursachen der Krebsentstehung sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass sich Tumorzellen durch genetische Instabilität auszeichnen und während der Karzinogenese viele genetische und epigenetische Veränderungen ansammeln [2, 3]. Diese beinhalten die Substitution einzelner Basen sowie Insertionen oder Deletionen und auch Veränderungen der Chromatinstruktur, wie beispielsweise veränderte Methylierungsmuster [3]. Das Prinzip der Karzinogenese basiert daher auf evolutionären Grundlagen, da eine Zelle durch bestimmte Mutationen Wachstumsvorteile erhält und sich verstärkt teilen kann [3, 4]. Bei diesem Prozess der klonalen Expansion spielt evolutionärer Druck der Tumorumgebung ebenfalls eine wichtige Rolle [4].

Hanahan und Weinberg definierten dazu verschiedene genetische Veränderungen und phänotypische Merkmale von Krebszellen, um die komplexen Vorgänge der Karzinogenese zu erklären [5, 6]. Während die Proliferation gesunder Zellen durch bestimmte Wachstumsfaktoren und Stimuli streng kontrolliert und orchestriert wird, haben Krebszellen die Eigenschaft erlangt, dauerhaft und unkontrolliert zu proliferieren [5]. Dies geschieht unter anderem durch eine erhöhte Produktion von Wachstumsfaktoren durch Tumorzellen selbst oder durch Zellen der Tumorumgebung. Des Weiteren entsteht die unkontrollierte, gesteigerte Proliferation der Tumorzellen durch die konstitutive Aktivierung von Onkogenen (*gain-of-function*-Mutation) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (*loss-of-function*-Mutation) [5, 7].

Aufgrund der erhöhten Proliferationsrate haben Tumorzellen einen erhöhten Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff. Durch die Bildung neuer Blutgefäße kann eine ausreichende Versorgung weiterhin gewährleistet werden. Dieser Prozess der Neoangiogenese ist normalerweise streng kontrolliert, Tumorzellen jedoch haben Mechanismen entwickelt, die Neoangiogenese selbst zu initiieren [8, 9]. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF). In Tumorzellen wird dessen Produktion beispielsweise unter hypoxischen Bedingungen durch onkogene Signale aktiviert [5, 10]. Aber auch tumorinfiltrierende Immunzellen [11] sowie aus dem Knochenmark rekrutierte vaskuläre Vorläuferzellen [12] sind an der Angiogenese im Tumormilieu beteiligt.

Um den hohen Energiebedarf von schnell proliferierenden Tumorzellen zu decken, kommt es auch zu Veränderungen des zellulären Energiemetabolismus. Otto Warburg zeigte schon 1927, dass sich der Energiemetabolismus von Tumorzellen und gesunden Zellen stark unterscheidet [13, 14]. Unter aeroben Bedingungen wird in normalen Zellen der überwiegende Teil des Energiebedarfs durch oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien gedeckt. Dabei entsteht aus einem Molekül Glukose Energie in Form von insgesamt 38 Molekülen ATP. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat nicht in Mitochondrien importiert, sondern direkt in Laktat umgewandelt. Dadurch wird die Glykolyse zur wichtigsten ATP-Quelle [15]. Dieser Prozess liefert jedoch deutlich weniger Energie, da nur 2 ATP-Moleküle pro Glukosemolekül gebildet werden [16, 17]. Durch die schnelle, unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen kommt es im Tumormilieu häufig zu einer Sauerstoffunterversorgung, wodurch die anaerobe Glykolyse durch den Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor-1 (HIF-1) initiiert wird [18]. Dabei wird durch die gesteigerte Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3 sowie vieler Enzyme der Glykolyse die schlechtere Energiebilanz ausgeglichen [5, 16, 17]. Tumorzellen weisen dadurch einen erhöhten Glukoseverbrauch auf [19].

Das Besondere ist jedoch, dass Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen Glykolyse als Hauptenergiequelle nutzen. Dieser Effekt der aeroben Glykolyse wird auch „Warburg Effekt“ genannt [13]. Neben der besseren Adaption an die Hypoxie der Tumorumgebung wird dadurch auch die Bereitstellung von Grundstoffen für die Proliferation gesichert, da Zwischenprodukte der Glykolyse wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von Nukleosiden und Aminosäuren sind [20]. Dadurch haben Tumorzellen einen evolutionären Wachstumsvorteil gegenüber nicht-malignen Zellen, da sie trotz schlechterer Energiebilanz der aeroben Glykolyse schneller größere Mengen an Energie bereitstellen können, als über oxidative Phosphorylierung. Dies zeigt sich auch darin, dass besonders invasive und metastasierende Tumoren eine erhöhte Glykolyserate aufweisen [17].

Weitere wichtige Faktoren bei der Entstehung von Krebs sind der Aufbau des Tumorstromas und der Tumormikroumgebung sowie die Fähigkeit von neoplastischen Zellen zur Immunevasion [5]. In den folgenden Abschnitten wird auf diese Punkte detaillierter eingegangen.

## **3.2 Das Tumormikromilieu**

### **3.2.1 Hypoxie und Azidose in der Tumormikroumgebung**

Wie bereits beschrieben, ist die Tumormikroumgebung aufgrund des hohen Nährstoff- und Sauerstoffbedarfs schnell proliferierender Zellen durch hypoxische Bereiche gekennzeichnet [5], welche schon zu einem frühen Zeitpunkt in der Karzinogenese entstehen können [4]. Je weiter Tumorzellen von Blutgefäßen entfernt sind, desto schlechter ist die Sauerstoffversorgung. Aufgrund der Sauerstoffunterversorgung, wird die Expression von HIF-1 induziert, wodurch wiederum unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden, um Tumorzellen an Hypoxie zu adaptieren. Dazu zählen verstärkte Angiogenese, Invasion und Metastasierung [21], die Anpassung des Energiemetabolismus [17] sowie die pH-Wert-Regulation [22, 23].

Die Regulation des intrazellulären pH-Wertes ist ein wichtiger Faktor bei der Anpassung von Tumorzellen an das Tumormilieu. Der pH-Wert des extrazellulären Tumormilieus (pHe) variiert im leicht sauren Bereich zwischen 5,6 und 6,8, wohingegen der intrazelluläre pH Wert (pHi) im leicht alkalischen Bereich zwischen 7,2 und 7,5 liegt [21]. Das Aufrechterhalten des neutralen bis leicht alkalischen pHi ist essentiell für das Überleben der Tumorzellen, da zelluläre Vorgänge wie die Glykolyse und die Proteinsynthese stark pH-abhängig sind [24, 25].

Für die Ansäuerung des extrazellulären Tumormilieus (Azidose) ist unter anderem die gesteigerte Glykolyserate der schnell proliferierenden Zellen ausschlaggebend, da es dadurch vermehrt zur Ansammlung saurer Produkte, wie Laktat und Kohlensäure, kommt [18, 26]. Zusätzlich führt die verstärkte ATP-Hydrolyse sowie der Aminosäurestoffwechsel zur Ausschleusung von Protonen und damit zu einer weiteren Azidifizierung des Tumormilieus [27].

Das schnelle Tumorwachstum führt also zunächst zu Hypoxie und anschließend zu Azidose im extrazellulären Milieu. Diese Entwicklung geht mit fortschreitender Malignität des Tumors einher, da die saure, sauerstoffarme Tumorumgebung zu einer gesteigerten Chemo- und Radioresistenz [28], einer erhöhten Metastasierung, Invasion [29, 30] und zu einer gesteigerten Mutationsrate führt [17]. Des Weiteren trägt die Azidose zur Immunevasion von Tumorzellen bei, da die Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die zytolytische Aktivität von zytotoxischen T-Zellen inhibiert wird [31]. Die Adaption an Hypoxie und Azidose stellt also einen weiteren Selektionsmechanismus in der Tumorentwicklung während der klonalen Expansion dar. Um ein Absinken des pHi zu verhindern, werden vermehrt Protonen aus der Tumorzelle ins extrazelluläre Milieu befördert. Dies geschieht auch in gesunden Zellen über Protonenpumpen, wie V-ATPasen, die bei Brustkrebs eine entscheidende Rolle bei der Tumordinvasion und der Chemoresistenz spielen können [27, 32, 33]. Zusätzlich tragen Natrium-Protonen-Austauscher, Monokarboxylat-Transporter, welche Laktat bidirektional ausschleusen und Bikarbonat-Austauscher und Transporter, die Protonen ausschleusen und Bikarbonat importieren, zur Alkalisierung des pHi bei [18]. Eine weitere wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des pHi spielt die Enzymgruppe der Carboanhydrasen, welche in folgenden Abschnitten detaillierter betrachtet werden [18].

### 3.2.2 Die Rolle der Carboanhydrasen in der Tumorprogression

Carboanhydrasen spielen eine wichtige Rolle bei der pHi-Regulierung von Tumorzellen. Dabei handelt es sich um eine Familie von Zink-Metalloenzymen, welche die reversible Hydratation von CO<sub>2</sub> zu Kohlensäure katalysieren. Kohlensäure ist jedoch instabil und zerfällt rasch in Bikarbonat und ein Proton. Das produzierte Bikarbonat fungiert dabei als Puffersystem zur Aufrechterhaltung eines leicht alkalischen pHi [18, 27].

Zusätzlich sind Carboanhydrasen auch an physiologisch wichtigen Prozessen, wie der Atmung, der Regulierung des Säure-Base-Haushalts, der Elektrolytsekretion und an der Glukoneogenese beteiligt [34].

Carboanhydrasen werden ubiquitär sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten exprimiert und durch vier Genfamilien ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Carboanhydrasen) codiert. Dabei kommen  $\alpha$ -Carboanhydrasen in Wirbeltieren, Algen, Bakterien und Pflanzen vor und umfassen 13 aktive und 3 inaktive Isozyme [35]. Diese unterscheiden sich in ihrer enzymatischen Aktivität und ihrer zellulären Lokalisation. Die aktiven  $\alpha$ -Carboanhydrasen umfassen die an der Plasmamembran lokalisierten Isoformen IV, IX, XII, XIV und XV, deren aktive Zentren jeweils im extrazellulären Raum liegen. Des Weiteren zählen zu dieser Gruppe die zytosolischen Isozyme I, II, III, VII und XIII sowie die in Mitochondrien lokalisierten Subklassen VA und VB. Zusätzlich wird die Isoform VI sekretiert. Drei Carboanhydrasen VIII, X und XI hingegen besitzen keine enzymatische Aktivität [18, 35].

Die beiden membranständigen Carboanhydrasen IX und XII sind tumorassoziiert und spielen bei der Tumorprogression sowie der Stabilisierung des pHi eine wichtige Rolle [18, 34].

#### 3.2.2.1 Carboanhydrase IX (CAIX)

Die CAIX weist unter den Carboanhydrasen eine besondere Struktur auf. Neben der katalytischen CA-Domäne, der Transmembrandomäne und dem kleinen intrazellulären Teil besitzt sie als einzige eine zusätzliche Proteoglykandomäne. Aufgrund dessen zeigt sie neben der intrazellulären CAII die höchste Enzymaktivität, welche auch bei niedrigen pH-Werten gewährleistet ist [18, 34]. Die CAIX-Expression wird unter hypoxischen Bedingungen durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert und trägt somit aktiv zur Anpassung an die hypoxische, saure Tumormikroumgebung bei.

Das Tumorsuppressorprotein von Hippel-Lindau (pVHL) reduziert wiederum unter normalen Sauerstoffbedingungen die Expression von CAIX, da es am Abbau der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit beteiligt ist und somit die Aktivierung durch HIF-1 verhindert [34, 36, 37]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Expression von CAIX *in vitro* auch durch die Ansäuerung des Kulturmediums sowie durch geringe Glukose- und Bikarbonatkonzentrationen gesteigert werden kann [38, 39]. CAIX trägt also selbst auch zur Azidifizierung des Tumormilieus bei [40].

Interessanterweise wird CAIX unter physiologischen Bedingungen nur in wenigen Geweben exprimiert. Dazu zählen Epithelien des Magens, der Gallengänge, des Dickdarms und des Dünndarms [18, 41]. In verschiedenen Tumorarten ist CAIX jedoch sehr stark exprimiert, etwa bei Kolorektaltumoren [42], Magen- und Ovarialtumoren [43], Bauchspeicheldrüsenkrebs [44] und Brustkrebs [45].

Generell gilt CAIX bei Tumoren als negativer prognostischer Marker [46-48] und ist beispielsweise bei invasivem Brustkrebs mit geringeren Überlebenschancen assoziiert [45, 49, 50]. Zusätzlich scheint eine starke CAIX-Expression die Invasion und die Migration von Tumorzellen zu fördern [48, 51] und die Resistenz von Tumorzellen gegenüber der Strahlentherapie zu erhöhen [28].

### 3.2.2.2 Carboanhydrase XII (CAXII)

Die CAXII ist ebenfalls membranständig und tumorassoziiert. Ihre Expression scheint ebenfalls Hypoxie-induzierbar zu sein, obwohl eine direkte Regulierung über HIF-1 noch nicht bewiesen wurde [18]. Bisher konnte jedoch gezeigt werden, dass CAXII in pVHL-defizienten Nierenzellkarzinomen überexprimiert wird [52]. Barnett *et al.* zeigten, dass die Expression von CAXII bei Brustkrebszellen auch durch die Bindung von Östrogen an den Östrogenrezeptor ER- $\alpha$  induziert werden kann [53].

In gesunden Geweben wird CAXII hauptsächlich in der Bauchspeicheldrüse, den Nieren und im Darm exprimiert. In Tumorgewebe ist die Expression jedoch deutlich höher [18, 54]. Eine Überexpression von CAXII wurde in Nierenzellkarzinomen, Gehirntumoren sowie bei Kolorektal-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs beobachtet [55]. Die Expression von CAXII fördert zudem die Invasion und Migration aggressiver Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* [56] und korreliert mit einer hohen Malignität und einer schlechteren Prognose bei Gliomen [18].

Generell konnte gezeigt werden, dass die Expression von CAXII bei verschiedenen Arten von Gehirntumoren mit steigender Malignität ebenfalls zunimmt. Da gesundes Hirngewebe frei von CAXII ist, stellt das Enzym ein interessantes Ziel zur Therapie von malignen Hirntumoren dar [57]. Die Blockierung von CAXII durch den monoklonalen Antikörper 6A10 wurde in dieser Arbeit untersucht [58, 59].

### 3.2.2.3 Carboanhydrase XII und Chemoresistenz von Tumorzellen

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika ist einer der Hauptgründe für das Therapieversagen bei Krebspatienten. Azidose und die damit verbundenen molekularen Mechanismen spielen dabei eine entscheidende Rolle, da die Aufnahme von Chemotherapeutika generell in einem sauren Tumormilieu reduziert ist und damit der therapeutische Effekt limitiert wird [18].

Ein chemoresistenter Phänotyp wird jedoch hauptsächlich durch die Expression von *multi drug resistance* (MDR)-Proteinen vermittelt. Dabei handelt es sich um Plasmamembranpumpen, die unter ATP-Hydrolyse unterschiedlichste toxische Substanzen in den extrazellulären Raum ausschleusen und dadurch deren intrazelluläre Konzentration sowie die toxische Wirkung stark verringern. MDR-Proteine gehören zur Familie der *ATP binding cassette*-Transporter (ABC-Transporter), welche evolutionär stark konserviert sind und in allen lebenden Organismen vorkommen. MDR-Pumpen besitzen keine Substratspezifität. Es werden zwar vermehrt hydrophobe Verbindungen ausgeschleust, unterschiedliche Subfamilien der ABC-Transporter können jedoch auch amphipathische Anionen oder Kationen exportieren [60]. Die physiologische Rolle der MDR-Transporter besteht darin, körpereigene Zellen vor Toxinen zu schützen [60].

Bei Menschen kommen MDR-Transporter aus drei ABC-Transporterfamilien vor: ABCB, ABCC und ABCG. Einer der am häufigsten vorkommenden Vertreter der ABCB-Familie ist das *multidrug resistance protein 1* (MDR1), das auch als P-Glykoprotein (P-GP) bezeichnet wird. P-GP wird in gesunden Geweben stark in den apikalen Membranen von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes sowie der Leber, der Nieren und des Gehirns exprimiert. Alle ABC-Transporter weisen eine ähnliche Struktur auf: Sie bestehen aus zwei Transmembrandomänen (TMD), welche die Substratbindestelle bilden sowie zwei Nukleotidbindedomänen (NBD).



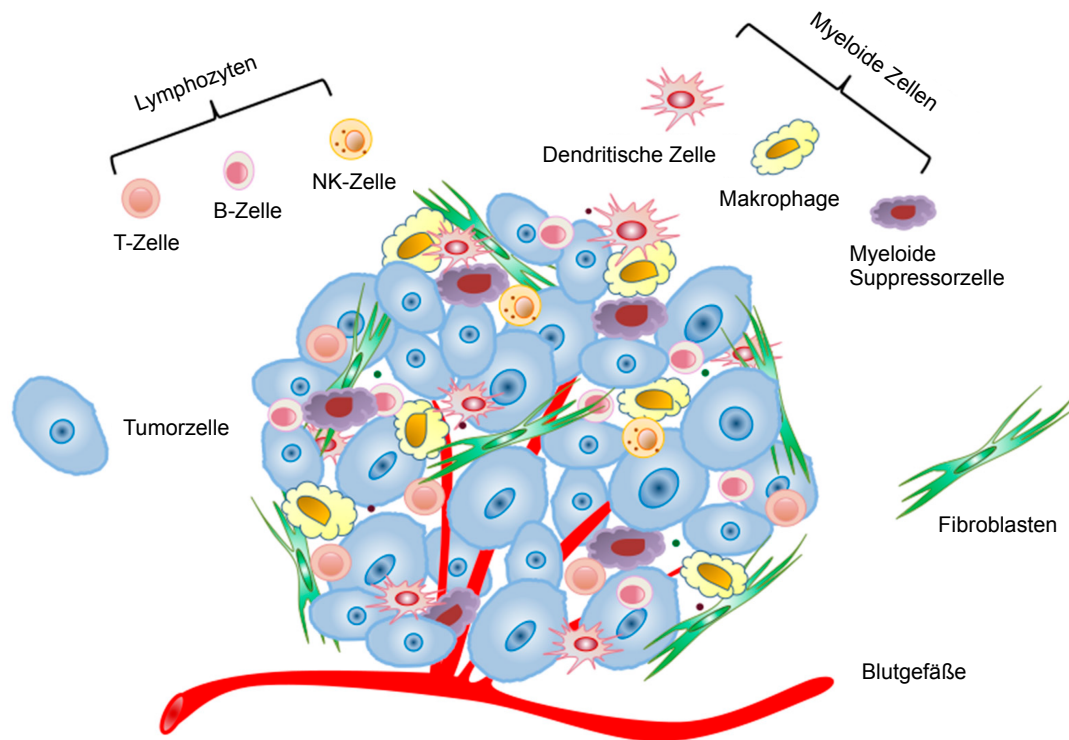
Beide NBD bilden eine ATP-Bindestelle und hydrolysieren ATP, wodurch es zu einer Konformationsänderung und zum Ausschleusen des Substrats in den extrazellulären Raum kommt [61]. P-GP weist ein breites Substratspektrum auf zu dem wichtige Chemotherapeutika gehören, wie die Gruppe der Anthrazykline, Taxane, Vincaalkaloide und Tubulin-polymerisierende Medikamente, wie zum Beispiel Paclitaxel [60, 62]. Aufgrund der großen Substratvariabilität stellt die Expression von P-GP bei der Chemotherapie ein großes Hemmnis dar.

Die Gruppe um Riganti entdeckte kürzlich, dass CAXII eine essentielle Rolle für die Funktion von P-GP zu spielen scheint. CAXII wird mit P-GP in vielen chemoresistenten Tumorzellen koexprimiert. Durch verschiedene Experimente konnte gezeigt werden, dass P-GP mit CAXII kolokalisiert und die Expression beider Proteine durch gesteigerte Zugabe des Anthrazyklins Doxorubicin induziert werden kann [62]. Interessanterweise führte die Inhibition von CAXII durch chemische Inhibitoren zu einer Sensitivierung chemoresistenter Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika, was die elementare Rolle der CAXII für die Funktion von P-GP unterstreicht [62, 63].

Aufgrund dieser Datenlage wurde in der vorliegenden Arbeit die Inhibierung von CAXII durch den spezifischen Antikörper 6A10 auf chemoresistenten Brustkrebszellen *in vitro* und *in vivo* analysiert.

### **3.2.3 Immunevasion von Tumorzellen**

Solide Tumoren bestehen nicht nur aus neoplastischen Zellen, es handelt sich vielmehr um ein komplexes System aus malignen Tumorzellen und Tumorstroma, das unter anderem von Fibroblasten, Blutgefäßen, Matrixproteinen sowie Kollagenen und Fibronectin gebildet wird [64, 65]. Dvorak beschrieb 1986, dass die Tumormikroumgebung zusätzlich durch vermehrt infiltrierende Immunzellen, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen sowie Lymphozyten gekennzeichnet ist [66]. Eine schematische Übersicht der tumorinfiltrierenden Zellen ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung tumorinfiltrierender Zellen. Neben Lymphozyten wie B-, T- und NK-Zellen infiltrieren auch myeloide Zellen, wie Dendritische Zellen, Makrophagen und myeloide Suppressorzellen Tumoren. Modifizierte Abbildung nach [67].

Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Immunzellen als Angriff des Immunsystems auf die Tumorzellen zu verstehen sind. In der Tat können zytotoxische T-Zellen Tumorantigene erkennen und die Lyse von Tumorzellen initiieren. Neueste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass tumorinfiltrierende Immunzellen durch die Bildung eines pro-inflammatorischen Milieus auch einen wachstumsfördernden Einfluss auf Tumorzellen haben können und aufgrund dessen von Tumorzellen selbst rekrutiert werden [68]. Tumorzellen haben Mechanismen entwickelt, um in Gegenwart eines funktionalen Immunsystems zu wachsen und sogar Immuneffektorfunktionen zur Tumorprogression zu nutzen. Einige Beispiele hierzu werden im folgenden Abschnitt detaillierter erläutert.

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind einerseits an der antitumoralen Immunabwehr essentiell beteiligt, da aktivierte T<sub>H</sub>1-CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten die Antigenpräsentation steigern und somit die tumorspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort regulieren. T<sub>H</sub>2-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können jedoch durch die Sekretion verschiedener Interleukine die antitumorale T-Zellantwort inhibieren und die Proliferation von Tumorzellen fördern [68].

Ein weiteres Beispiel sind regulatorische T-Zellen (Tregs). Sie dienen in gesunden Geweben der Prävention autoreaktiver T-Zellantworten und können Immunreaktionen durch die Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-10, TGF- $\beta$ ) oder durch die Expression von *Immune-checkpoint*-Rezeptoren (z.B. PD-1, CTLA-4) supprimieren. Mittlerweile ist bekannt, dass Tumorzellen jedoch Tregs durch die Sekretion von CCL17, CCL5 oder CCL28 rekrutieren und ihre immunsupprimierende Funktion nutzen, um antitumorale Immunreaktionen von tumorspezifischen T-Lymphozyten oder NK-Zellen zu unterdrücken [69, 70]. Eine hohe Anzahl an Tregs im Tumorstroma ist daher ein negativ-prognostischer Marker bei Glioblastomen [71] und Melanomen [72].

Neben der Rekrutierung von Immunzellen können Tumorzellen auch durch die Sekretion bestimmter Faktoren, wie TGF- $\beta$  und Adenosin, die Immunevasion einleiten und dadurch antitumorale Immunantworten unterdrücken [69].

Im folgenden Abschnitt wird der immunsupprimierende Effekt von Adenosin im extrazellulären Tumormilieu detaillierter betrachtet.

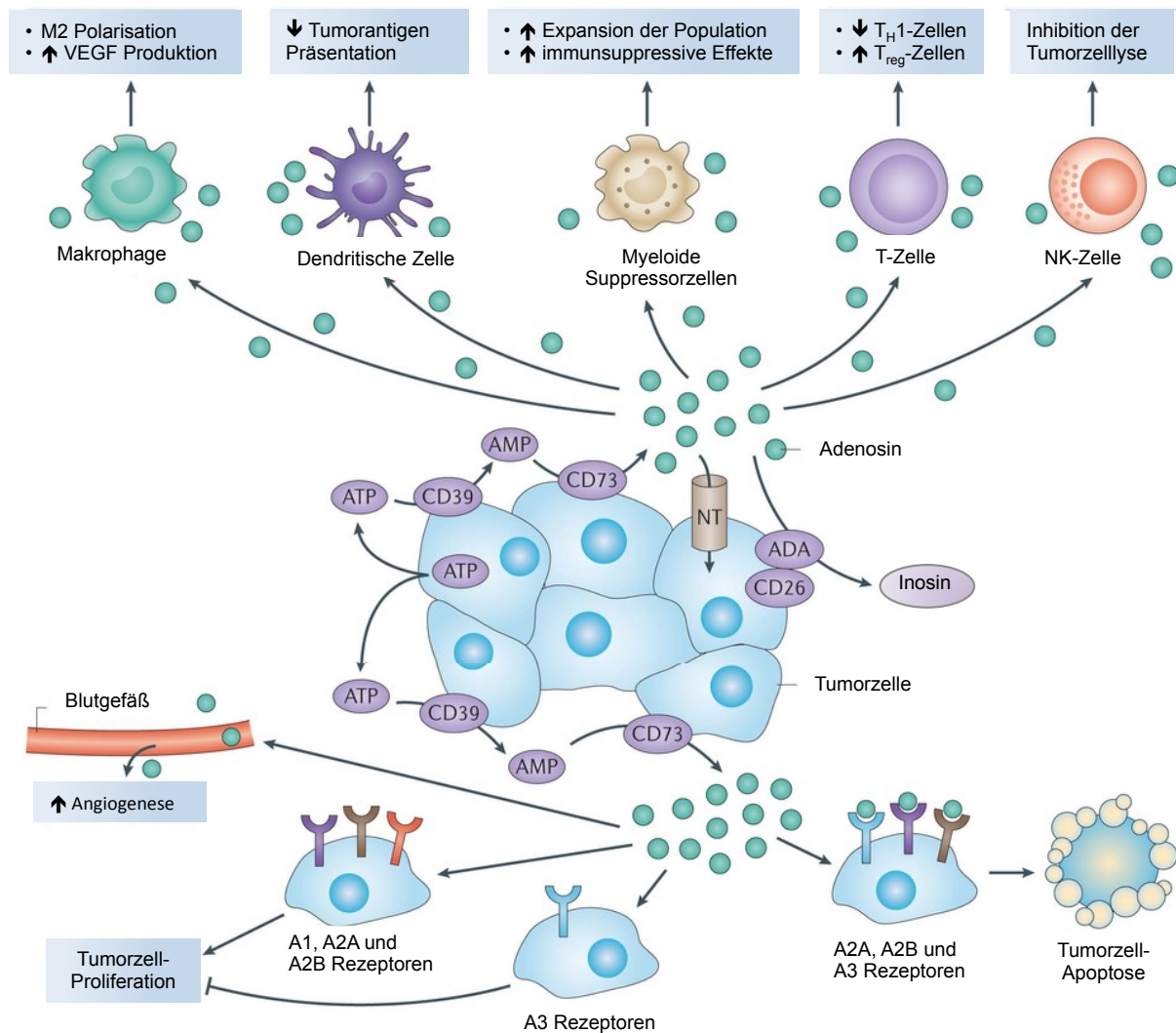
### 3.2.3.1 CD73 und Adenosin im extrazellulären Tumormilieu

Die Fähigkeit der Immunevasion von Tumorzellen spielt bei der Entstehung maligner Tumoren eine entscheidende Rolle [5]. Ein wichtiger Mechanismus stellt dabei die Anreicherung von Adenosin im extrazellulären Tumormilieu dar. Dies wird von der 5'-Ektonukleotidase (NT5E) durch die Hydrolyse von AMP zu Adenosin und einem freien Phosphat-Ion produziert. NT5E, auch als CD73 bezeichnet, ist ein membranständiges, homodimeres Enzym, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankert ist. CD73 besteht aus zwei Domänen, welche in einer offenen und geschlossenen Konformation vorkommen und während einer enzymatischen Reaktion eine starke Konformationsänderung durchlaufen [73, 74]. Zusätzlich ist eine lösliche Form von CD73 bekannt, die durch die Hydrolyse des GPI-Ankers von der Plasmamembran abgespalten wird und im Blut sowie anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar ist [75, 76].

CD73 wird von gesunden Zellen in verschiedenen Organen exprimiert, darunter Darm, Nieren, Gehirn, Leber, Lunge und Milz. Des Weiteren findet sich CD73 auf Endothelien von Gefäßen, wie beispielsweise der Aorta, der Koronararterien und der afferenten Lymphgefäße [77]. Dort fungiert es als Adhäsionsmolekül und spielt bei der Bindung von Lymphozyten an Endothelzellen eine wichtige Rolle. Zusätzlich ist CD73 in physiologische Prozesse, wie den epithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransport bei sekretorischen oder resorptiven Prozessen des Darms involviert [78, 79]. Die Expression von CD73 wird hauptsächlich durch Hypoxie induziert und über HIF-1 gesteuert, kann aber auch durch andere inflammatorische Mediatoren, wie TGF- $\beta$  oder Interferone, induziert werden.

CD73 wird auf Tumorzellen, aber auch auf tumorinfiltrierenden Immunzellen, wie Tregs, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten exprimiert [74, 80] und ist neben der Immunevasion auch in Prozesse, wie der Zellproliferation und der Apoptose involviert. Dabei scheint CD73 besonders das Wachstum von Kolonkarzinomen, Melanomen und Lymphomen zu verstärken [77]. Eine hohe Expression von CD73 wird auch bei Brustkrebs [81], Gliomen, Melanomen, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen [82] und Ovarialkarzinomen [83, 84] beobachtet [77] und ist mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert. Zudem scheint CD73 die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu fördern [81, 85, 86] und ist an der Zellmigration und -invasion [87], der Metastasierung [88] sowie der Neoangiogenese beteiligt [89].

In Abbildung 2 wird die Akkumulation von Adenosin im extrazellulären Tumormilieu sowie die Rolle bei der Immunevasion genauer erläutert. AMP als Substrat für CD73 ist nicht direkt verfügbar, sondern wird durch die E-NTPDase CD39 durch Hydrolyse von extrazellulärem ATP produziert [5, 90]. Die Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum wird meist aufgrund zellulären Stresses, wie Hypoxie, Ischämie oder Entzündungen ausgelöst. ATP dient entweder selbst als Signalmolekül oder wird von CD39 zu AMP umgewandelt und fungiert als Substrat für CD73. Die Konzentration an extrazellulärem Adenosin wird durch die Aktivität der Ektoenzyme CD73 und CD39 gesteuert, wird aber auch über die membranständige Adenosindeaminase (ADA) zu Inositol umgewandelt oder durch Nukleosidtransporter entlang des Konzentrationsgradienten wieder in die Zelle importiert [74, 75] (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Die Rolle von Adenosin und CD73 in der Tumormikroumgebung. ATP wird durch Stressfaktoren, wie Hypoxie von Tumorzellen freigesetzt und durch CD39 zu ADP und AMP umgewandelt. AMP dient als Substrat für CD73, welches AMP in Adenosin und inorganisches Phosphat hydrolysiert. Adenosin wird entweder direkt durch Nukleosidtransporter in die Zelle importiert, durch Adenosindeaminase (ADA) zu Inositol umgewandelt oder fungiert als Signalmolekül. Die Signalwirkung von Adenosin wird durch Adenosinrezeptoren auf Zielzellen vermittelt. Je nach Rezeptor wird die Proliferation der Zielzellen aktiviert (A1, A2A und A2B Rezeptoren) oder inaktiviert (A3 Rezeptor). Neben der Apoptose von Tumorzellen wird durch Adenosin die Angiogenese durch Adenosinrezeptoren auf Endothelzellen oder die Aktivierung der VEGF-Freisetzung von Tumorzellen gesteuert. Die Immunevasion von Tumorzellen wird durch Effekte von Adenosin auf tumorinfiltrierende Immunzellen erzielt. M1-Makrophagen werden inhibiert und die Polarisation von M2-Makrophagen gefördert, was zu verstärkter VEGF-Produktion und damit zu gesteigerter Angiogenese beiträgt. Adenosin inhibiert zudem die Antigenpräsentation von Dendritischen Zellen und fördert die Rekrutierung und immunsupprimierenden Effekte von myeloiden Suppressorzellen. Tregs werden durch Adenosin aktiviert und inhibieren antitumorale Effekte von zytotoxischen T-Zellen, T<sub>H</sub>1-Zellen aber auch NK-Zellen. Zudem wird die Tumorzelllyse von NK-Zellen beeinträchtigt. Modifizierte Abbildung nach [74].

Adenosin fungiert als Signalmolekül und bindet an verschiedene G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Diese Rezeptoren werden in vier Gruppen A1, A2A, A2B und A3 unterteilt und stimulieren unterschiedlichste Signalwege. Diese führen zur Aktivierung (Rezeptoren A1, A2A und A2B) oder zur Inhibierung (Rezeptor A3) der Tumorzellproliferation sowie zur Induktion von Apoptose. Zusätzlich steigert Adenosin die Angiogenese, da auch Endothelzellen Adenosinrezeptoren exprimieren und zusätzlich die Produktion von VEGF von Tumorzellen, aber auch von rekrutierten Immunzellen aktiviert wird [74, 91].

Adenosin wirkt auf unterschiedliche Immunzellen des Tumormilieus und vermittelt dadurch stark immunsupprimierende Effekte. Tumordinfiltrierende Makrophagen des M1-Typs sind beispielsweise an der Tumorabwehr beteiligt. Sie werden jedoch von Tumorzellen rekrutiert, wobei durch Adenosin die Polarisation zu M2-Makrophagen und somit die Inhibierung der tumorsupprimierenden Funktion initiiert wird. M2-Makrophagen tragen dann durch die Produktion von VEGF zur Induktion der Angiogenese [92] und durch Steigerung der Zellproliferation und der Metastasierung aktiv zur Tumorprogression bei [74, 93].

Des Weiteren reduziert Adenosin auch die Fähigkeit von Dendritischen Zellen Tumorantigene zu präsentieren. Dies geschieht durch die Aktivierung des A2A-Rezeptors während der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen, was zu einem veränderten Phänotyp führt. Sie exprimieren dann vermindert den für Dendritische Zellen charakteristischen Marker CD1a und zeigen gesteigerte VEGF-Produktion, wodurch das Tumorwachstum und die Angiogenese gefördert werden [94]. Zudem führt Adenosin zu einer Deaktivierung der Dendritischen Zellen, wodurch die Antigenpräsentation vermindert wird [95]. Des Weiteren werden durch Adenosin Tregs aktiviert, welche dann immunsupprimierende Effekte durch Inhibierung von zytotoxischen T-Zellen,  $T_H1$ -Zellen aber auch NK-Zellen vermitteln. Zusätzlich kann durch Adenosin die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen verhindert werden, indem die Freisetzung der Granula und die Adhäsion an Tumorzellen beeinträchtigt wird [74]. Generell ist es wichtig zu erwähnen, dass Adenosin nicht nur von Tumorzellen produziert wird. Es handelt sich vielmehr um ein Zusammenspiel von Tumorzellen und tumordinfiltrierenden Immunzellen, welche ebenfalls CD39 und CD73 exprimieren und zur Akkumulation von Adenosin im extrazellulären Tumormilieu und dadurch zur Immunevasion der Tumorzellen beitragen [74]. Dazu gehören z.B. CD73-positive myeloide Suppressorzellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) [96].

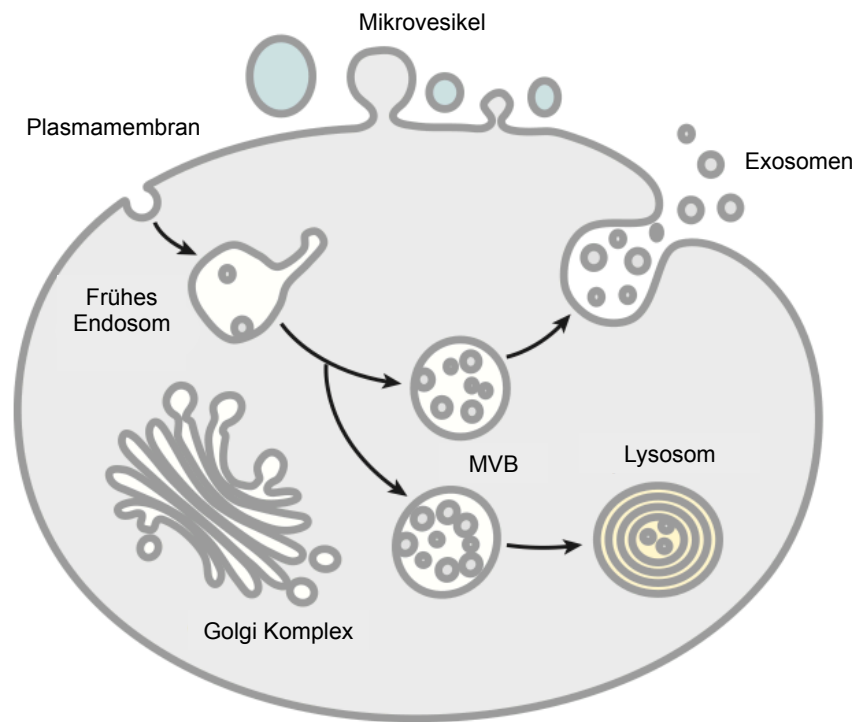
Aufgrund der zentralen Rolle von CD73 bei verschiedenen Tumorerkrankungen ist die Entwicklung anti-CD73 spezifischer Tumorthérapien Ziel vieler Studien. In verschiedenen *in vivo* Tumormodellen führte die Inhibierung von CD73 zu vermindertem Tumorwachstum durch die Reaktivierung der adaptiven antitumoralen Immunantwort [97], sowie zu einer verringerten Metastasierung und Angiogenese [74, 98]. Neben dem chemischen Inhibitor Adenosin-5'-( $\alpha,\beta$ -methylen)diphosphat (APCP) werden insbesondere blockierende monoklonale Antikörper zur Therapie entwickelt. In dieser Arbeit wurde daher der Effekt eines neu entwickelten anti-CD73 Antikörpers (22E6) auf die Funktion von humanem CD73 und auf Tumorzellen untersucht.

### **3.3 Extrazelluläre Vesikel**

Extrazelluläre Vesikel (EV) sind Membranvesikel, welche von allen Körperzellen gebildet werden. Die Freisetzung von EV scheint ein evolutionär konservierter Prozess zu sein, da sowohl Eukaryoten als auch Prokaryoten EV in den extrazellulären Raum abgeben [99]. EV sind in verschiedensten Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin, Muttermilch, Aszites oder Speichel vorhanden [100].

Eukaryotische Vesikel werden in drei Gruppen eingeteilt, die sich in ihrem zellulären Ursprung, aber auch in ihrer Größe und ihrem Inhalt unterscheiden [100]: Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Vesikel. Letztere entstehen, wenn Zellen den Vorgang der Apoptose durchlaufen und dabei durch Knospung Vesikel einer Größe von bis zu 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser freisetzen. Mikrovesikel hingegen sind deutlich kleiner (20 nm – 1  $\mu\text{m}$ ) und entstehen durch Knospung von der Plasmamembran lebender Zellen.

Exosomen entstehen aus dem endolysosomalen Weg durch Knospung von der Plasmamembran und Fusion mit *multivesicular bodies* (MVB). Diese fusionieren entweder mit Lysosomen, was zum Abbau des Inhalts führt oder fusionieren mit der Plasmamembran und setzen so Exosomen (50 – 100 nm) in den extrazellulären Raum frei [100, 101]. Diese Vorgänge sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Biogenese extrazellulärer Vesikel (EV) in eukaryotischen Zellen. Mikrovesikel werden durch direkte Knospung von der Plasmamembran freigesetzt. Exosomen hingegen entstehen durch Knospung von der Plasmamembran in frühe Endosomen und *multi-vesicular bodies* (MVB). Diese fusionieren entweder direkt mit Lysosomen, was zum Abbau des Inhalts führt, oder setzen ihren Inhalt durch Fusion mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum frei. Modifizierte Abbildung nach [100].

EV tragen vielerlei zelluläre Proteine und zytosolische Komponenten. Dabei handelt es sich um Proteine der Endosomen, der Plasmamembran sowie des Zytosols und beinhalten Adhäsionsmoleküle, wie Tetraspanine (CD63, CD81) und Integrine, zytoplasmatische Proteine, Zytokine, aber auch Teile des Zytoskelettes, wie Aktin oder Tubulin [99, 102]. Zudem enthalten EV neben Proteinen auch Nukleinsäuren, wie DNA, mRNA und microRNAs, die sie effizient auf andere Zellen übertragen können [103].

EV fungieren also als wichtige Vehikel für die interzelluläre Kommunikation zwischen proximalen und distalen Zellen und geben sowohl Proteine als auch genetische Informationen an andere Zellen weiter [99, 104].



Auch Tumorzellen sekretieren EV, welche eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen. Bisher ist beschrieben, dass Tumor-EV antitumorale Immunreaktionen unterdrücken und somit die tumorale Immunevasion unterstützen [105-107], Metastasierung fördern [108, 109], onkogene Proteine auf andere Zellen übertragen [110] sowie Angiogenese fördern können [100, 101]. Tumor-EV chemoresistenter Zellen übertragen außerdem aktive MDR-Transporter, wie beispielsweise P-GP und tragen dadurch zur Chemoresistenz von Tumoren bei [111].

Zirkulierende Tumor-EV stellen eine vielversprechende Option als Biomarker zur Früherkennung von Tumorerkrankungen dar. Dabei ist die sogenannte *liquid biopsy* eine nicht-invasive Möglichkeit die Tumorprogression durch die Analyse spezifischer Tumormarker auf EV, welche aus Blut oder Urin von Patienten isoliert wurden, zu verfolgen [112]. Die Tatsache, dass Tumor-EV wichtige Tumormarker tragen wurde in dieser Arbeit genutzt um neue tumorspezifische Antikörper zu generieren [113]. In nachfolgendem Abschnitt wird auf die Bedeutung von Antikörpern in der Tumorthherapie detaillierter eingegangen.

### **3.4 Antikörper in der Krebsimmuntherapie**

Allgemein ist die Entwicklung neuer Therapien essentiell, um maligne Erkrankungen effizienter behandeln zu können. Die Nutzung des Immunsystems für die Tumorthherapie ist dabei ein Ansatz, welcher zu vielen neuen klinischen Konzepten und Therapien führte. Die Immuntherapie beinhaltet dabei neben der gesteigerten Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und Immuneffektorzellen auch immunologische Stimulanzien, adoptiven Transfer von Immunzellen und die Nutzung tumorspezifischer monoklonaler Antikörper [114].

Antikörper sind sehr stabile Moleküle und haben die Kapazität Antigene spezifisch und hoch affin zu binden. Erkennen Antikörper bestimmte Antigene auf Tumorzellen, macht sie das zu idealen Kandidaten für die Therapie und Diagnostik von Tumoren.

Seit den Anfängen der Produktion von monoklonalen Antikörpern 1975 durch Kohler und Milstein wurde die Technik weiterentwickelt, um Antikörper zur Therapie am Menschen einsetzen zu können [115]. Das *antibody engineering* umfasst dabei das Klonieren der spezifischen Immunglobulinsequenzen in eukaryotische Expressionssysteme, wodurch die Herstellung rekombinanter Antikörper in stabilen Produzentenzelllinien möglich ist [116]. Da monoklonale Antikörper aus einer Immunisierung von Tieren resultieren, handelt es sich um fremde Proteine, die vom humanen Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Dieses Problem kann durch die Chimärisierung von Antikörpern umgangen werden. Dabei werden die variablen Regionen des Antikörpers, welche die Antigene binden, mit humanen konstanten Teilen fusioniert. Diese chimären Antikörper sind dann zu 70 % human und besitzen einen vollständig humanen Fc-Teil [117]. Eine Weiterentwicklung davon ist die Humanisierung von Antikörpern. Dabei werden die hypervariablen Regionen der Antigenbindestelle eines vollständig humanen Antikörpers mit den hypervariablen Regionen des therapeutischen Antikörpers ersetzt. Dadurch entsteht ein humanisierter Antikörper, welcher zu 85-90 % human und deutlich weniger immunogen ist. Zudem können über den humanen Fc-Teil Effektorfunktionen ausgeübt werden [118, 119]. Diese Effektorfunktionen beinhalten Interaktionen mit verschiedenen Rezeptoren auf der Oberfläche unterschiedlicher Zelltypen. Dazu zählt die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) auf beispielsweise Makrophagen, Epithelzellen und Monozyten, was zu einer deutlichen Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Antikörpern von einem Tag auf bis zu mehrere Wochen führt [120]. Im folgenden Abschnitt wird allgemein auf die Wirkungsweise therapeutischer Antikörper detaillierter eingegangen.

### **3.4.1 Wirkung therapeutischer Antikörper**

Wie bereits erwähnt können Antikörper nach Bindung an Antigene auf der Tumorzelle zusätzliche Effektorfunktionen über den Fc-Teil ausüben. Dies geschieht durch die Bindung an Fcγ-Rezeptoren (FcγR), wodurch die Komplementkaskade (CDC – Komplement abhängige Zytotoxizität) oder die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) aktiviert werden kann.

NK-Zellen sind dabei die Hauptvermittler der ADCC und werden durch die Interaktion des Fc-Teils mit FcγRIIIa aktiviert, was die Bildung einer immunologischen Synapse induziert. Diese löst die Freisetzung von Perforin und Granzymen aus und induziert durch die Interaktion von Fas und Fas-Ligand die Apoptose der Tumorzelle [121]. Die ADCC spielt eine wichtige Rolle bei der Wirksamkeit antitumoraler therapeutischer Antikörper. Die Effizienz ist dabei stark von speziellen Glykosylierungsmustern des Fc-Teils abhängig [122]. Aufgrund dessen gewinnt das *Fc engineering* oder *glycoengineering* bei der Entwicklung und Verbesserung der Wirksamkeit therapeutischer Antikörper immer mehr an Bedeutung [119].

Zusätzlich zu den Effektorfunktionen des Fc-Teils kommt es auch durch die Bindung von Antikörpern an Tumorantigene selbst zu spezifischen antitumoralen Effekten. Neben löslichen Antigenen, wie bei Bevacizumab (anti-VEGF), sind Oberflächenrezeptoren, Ektoenzyme auf Tumorzellen, aber auch hämatopoetische Differenzierungsmarker, wie CD20 (Rituximab) Ziele der Tumorthherapie. Durch die Bindung der Antikörper wird die Aktivität der Oberflächenproteine, aber auch die Interaktion der Antigene mit anderen Bindepartnern beeinflusst. Dies führt zu einer Intervention in essentielle Stoffwechselvorgänge, wodurch unter anderem die Zellproliferation der Tumorzellen beeinträchtigt wird [123].

Mehrere Antikörper sind bereits für die Tumorthherapie zugelassen. Dazu gehören zum Beispiel Rituximab (MabThera®), welcher an CD20 bindet und für die Behandlung von CD20-positiven malignen B-Zell-Erkrankungen, wie Non-Hodgkin-Lymphomen und der chronisch lymphatischen Leukämie eingesetzt wird. Rituximab wirkt hauptsächlich über ADCC und CDC und löst Apoptose der Tumorzellen aus [119, 123].

Ein weiteres Beispiel ist der Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), welcher den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 bindet und blockiert. Dies führt zu einer verminderten Zellproliferation und löst eine ADCC aus. HER2 wird vor allem bei Brustkrebs überexprimiert, weshalb Trastuzumab einzeln oder als adjuvante Therapie in Kombination mit konventioneller Chemotherapie bei fortgeschrittenem oder metastasierendem HER2-positivem Brustkrebs Anwendung findet [119, 123].

Antikörper werden auch konjugiert mit Toxinen oder radioaktiven Nukliden in der Chemoimmun- oder Radioimmuntherapie eingesetzt. Dabei wird die spezifische Bindung des Antikörpers an Tumorantigene genutzt um gezielt Chemotherapeutika oder Radioisotope zu Tumorzellen zu dirigieren. Dadurch kann eine spezifischere Therapie mit geringeren Nebenwirkungen erreicht werden [123].

Als Beispiel dient die Weiterentwicklung von Trastuzumab mit der Kopplung des Mikrotubuli-inhibierenden Maytansinoid DM1 (Trastuzumab-Emtansin, Kadcyla®). Die Therapie von HER2-positivem Brustkrebs mit Trastuzumab-Emtansin führte zu einer deutlichen Steigerung des progressionsfreien Überlebens, verglichen mit der Standardtherapie Trastuzumab plus Chemotherapie mit Docetaxel [124]. Ein Beispiel für die Radioimmuntherapie ist der Einsatz von Tositumomab (Bexxar®), welcher an CD20 bindet und mit <sup>131</sup>Iod konjugiert für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen verwendet wird [125].

### **3.5 Ziele dieser Arbeit**

Der in dieser Arbeit vorgestellte Antikörper 6A10 bindet und blockiert die Carboanhydrase XII, welche für die Homöostase des intrazellulären pH-Wertes wichtig ist. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 6A10 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu vermindertem Tumorwachstum führt [58, 59]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die antitumorale Wirkung von 6A10 in verschiedenen präklinischen Tiermodellen weiter zu untersuchen.

Des Weiteren wurde ein neuartiger Antikörper 22E6 charakterisiert, welcher durch eine Immunisierung mit EV einer Glioblastomzelllinie gewonnen wurde und das tumorassoziierte Ektoenzym CD73 bindet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von 22E6 auf die Funktion von zellulärem, vesikulärem und löslichem CD73 analysiert.

## 4 Material

### 4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Hera Cell 150)	Thermo Electro Corporation, USA
Durchflusszytometer (FACS Canto, LSR Fortessa)	BD Bioscience, Heidelberg
Filmentwickler (CP100)	AGFA, Mortsel (Belgien)
Gelelektrophoresesystem (Mighty Small)	Hoefer, Holliston, MA (USA)
Mikroplattenlesegerät (CLARIOstar®)	BMG Labtech, Ortenberg
Nanopartikel Tracking Analysator (ZetaView®)	Particle Metrix, Meerbusch
Nanophotometer (Nanodrop)	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Refraktometer	Reichert Technologies, Seefeld
Spannungsquelle (BIO-RAD Power Pac 200)	BioRad, München
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Taumelrollmischer TRM 50	IDL, Nidderau
Tischultrazentrifuge (TL100)	Beckmann Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 R)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (PICO 21 centrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer)	BioRad, München
Ultrazentrifuge (Optima L-60 & L-70)	Beckman Coulter
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge (Avanti J-26 XP)	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge (Multifuge 3 L-R)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Rotana 46RSC)	Hettich, Tuttlingen

## 4.2 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1x DPBS, 2 % FCS
LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
<b>Puffer für CD73 Aktivitätsassays</b>	
Glukosepuffer	2 mM MgCl <sub>2</sub> , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Glukose, 20 mM Hepes , pH 7,4
Glycinpuffer	75 mM Glycin, 5 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4
HEPES-Puffer	2 mM MgCl <sub>2</sub> , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Hepes , pH 7,4
Reaktionspuffer	0,4 % Ammoniummolybdat frisch Zugabe: 10 % Ascorbinsäure (w/v)
<b>Puffer für Western Blots</b>	
Bis/Tris-Acrylamid Sammelgel (4 %)	2,86 ml 1,25 mM Bis/Tris (pH6,8), 1,5 ml 30 % Acrylamid, 5,6 ml H <sub>2</sub> O, 100 µl 10 % APS, 10 µl TEMED
Bis/Tris-Acrylamid Trenngel (12 %)	4,29 ml 1,25 mM Bis/Tris (pH 6,8), 4 ml 30 % Acrylamid, 3,14 ml H <sub>2</sub> O, 100 µl 10 % APS, 4 µl TEMED
Blotpuffer (10x)	30,3 g/l Tris, 144 g/l Glycin, 0,4 % SDS (v/v)
Blotpuffer Arbeitslösung	1x Blotpuffer, 20 % Methanol
ECL-Lösung	ECL1: 0,1 M Tris/HCl (pH8,8), 200 mM p-Coumarinsäure, 1,25 mM Luminol ECL2: 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Arbeitslösung: 1 ml ECL1 + 3 µL ECL2

Laufpuffer	25 ml MOPS-Puffer, 2,5 ml 1 M Natriummetabisulfit, auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
nicht-reduzierender Laemmli-puffer (5x)	62,5 mM Tris/HCl, 20 % Glycerin (v/v), 2 % SDS (w/v), 0,0625 % Bromphenolblau (w/v)
reduzierender Laemmli-puffer (5x)	62,5 mM Tris/HCl, 20 % Glycerin (v/v), 2 % SDS (w/v), 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,0625 % Bromphenolblau (w/v)
RIPA-Lysepuffer+	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 % Igepal, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 1 Tablette Proteasinh inhibitor Cocktail
TBS (10x)	24,2 g Tris, 80 g NaCl, H <sub>2</sub> O ad 1 l
TBST	0,05 % Tween-20 in TBS

#### **Puffer für IP**

Kopplungspuffer (1x)	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH 8,3
Kopplungspuffer (3x)	0,3 M NaHCO <sub>3</sub> , 1,5 M NaCl, pH 8,3
NaOAc-Puffer	0,1 M NaOAc, 0,5 M NaCl
PBS	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
PBS+	PBS, 0,5 % N-Laurylsarcosine, 0,1 % SDS
Waschpuffer	0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 4
Laemmli-puffer für IP (3x)	5,15 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,5 % SDS (v/v), 3 ml Glycerin, 1,6 ml $\beta$ -Mercaptoethanol

**Puffer für LDH-Assay**

TRAP-Puffer	27,5 g/l Triethanolamin-HCl, pH 7,6
LDH-Reaktionspuffer	0,6 mM NADH in TRAP-Puffer 1,2 mM Pyruvat in TRAP-Puffer Mischen 1:1 vor Benutzung

**Puffer für Kryoschnitte und Immunhistologie**

Phosphatpuffer (20x)	29,25 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4,9 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 1 l H <sub>2</sub> O
Kryolösung	250 ml Glycerin, 250 ml Ethylenglycol, 500 ml 1x Phosphatpuffer
Peroxidaseblock	5 ml Methanol, 5 ml H <sub>2</sub> O, 100 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**Puffer für P-GP-Aktivitätsassay**

Ringerlösung	148,7 mM NaCl, 2,55 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,45 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4
Lysepuffer	10 mM Hepes/Tris, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, pH 7,4  plus frisch dazu: 2 mM PMSF, 1 mM Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin
Saccharosepuffer	10 mM Tris/HCl, 35 % Saccharose (w/v), 1 mM EDTA, pH 7,5
Zentrifugationspuffer	10 mM Tris/HCl, 250 mM Saccharose, pH 7,5
Reaktionspuffer	25 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,5 mM EGTA, pH 7,4  frisch Zugabe: 3 mM ATP, 3 mM DTT, 2 mM Ouabain, 3 mM NaN <sub>3</sub>



Stoppuffer	0,2 % Ammoniummolybdat (w/v), 1,3 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v), 0,9 % SDS (w/v), 2,3 % Trichloressigsäure (w/v), frisch Zugabe: 1 % Ascorbinsäure (w/v)
------------	--

### 4.3 Versuchstiere

Mausstamm	Bezugsstelle
NSG (NOD-scid IL2R $\gamma^{-/-}$ )	Charles River Laboratories Inc., USA
Athymic nude Foxn1 <sup>nu</sup>	Envigo, UK

### 4.4 Antikörper

Primärantikörper				
Antikörper	Klon	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Anti-Alix	3A9	Maus	1:250	BioLegend, USA
Anti-CA12	6A10	Ratte/IgG2a	20-100 µg/ml	AG Zeidler, HMGU
Anti-CA12	31560	Maus/IgG1	1:1000	R&D Systems, USA
Anti-CA9	MSC-8	Maus/IgG1	20-100 µg/ml	Prof. Renner, Universität Basel
Anti-CA9	10E12	Ratte/IgG2a	1:2 - 1:10	AG Zeidler, HMGU
Anti-CA9	20G9	Ratte/IgG2a	1:5	AG Zeidler, HMGU
Anti-Calnexin		Maus	1:1000	BD Biosciences,
Anti-CD63	24F9	Ratte/IgG2b	1:5000	AG Zeidler, HMGU
Anti-CD73	22E6	Ratte/IgG2a	0,5 – 10 µg/ml	AG Zeidler, HMGU
Anti-CD73		Kaninchen	1:3000	Abcam, USA
Anti-CD81	5A6	Maus	1:1000	BioLegend, USA
Anti-GST-R	6G9	Ratte/IgG2a	5 – 100 µg/ml	AG Zeidler, HMGU
Anti-IBA-1		Kaninchen	1:600	Wako, Japan
Anti-Vimentin	V9	Maus	1:50 - 1:500	Santa Cruz, USA
Anti- $\alpha$ Tubulin	GT114	Maus	1: 30.000	GeneTex, USA

<b>Sekundärantikörper</b>			
<b>Zielantigen</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Ratte IgG	HRP	1:2000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Maus IgG	HRP	1:2000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Kaninchen IgG	HRP	1:2000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Ratte IgG	Alexa-647	1:800	Jackson Immuno Research, USA
Anti-Maus IgG	Alexa-647	1:800	Jackson Immuno Research, USA

#### 4.5 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
0,8 µm Filter, CA-S	Schleicher & Schuell, Dassel
Alzet® Brain Infusion Kit 3	Durect, USA
Alzet® Mikroosmotische Pumpen (1002)	Durect, USA
Amersham™ Proctan™ Premium 0,45 µM	GE Healthcare, München
C-Chip Einweg Hemocytometer, Neubauer improved	NanoEnTek, Korea
CEA Medical X-Ray Screen Film blue sensitive	Agfa Healthcare NV, Belgien
Corning® Netwell® 12 Well Carrier Kit for 15mm	Corning, USA
Einfrierröhrchen, CryoTube™	NUNC, Thermo Scientific, USA
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger Superfrost Ultra Plus	Thermo Scientific / Menzel,
Reaktionsgefäße, Safe Lock, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugationsröhrchen 1,2 ml	Beckmann Coulter, USA
Ultrazentrifugationsröhrchen 35 ml	Kisker Biotech, Steinfurt
Ultrazentrifugationsröhrchen 4 ml, Ultra-Clear	Beckmann Coulter, USA
Mikrotiterplatten, versch. Größen	Corning, USA
Zellkulturschalen und -flaschen versch. Größen	Corning USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml (FALCON®)	Corning, USA

## 4.6 Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
102 nm Standardbeads	Particle Metrix, Meerbusch
AMP	Sigma Aldrich, USA
Antibody Diluent	Dako, Japan
APCP	Sigma Aldrich, USA
Aprotinin	Sigma Aldrich, USA
Aquatex®	Merck, Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, München
CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
DAB	DCS, Hamburg
DAB Substrat Puffer	DCS, Hamburg
Daunorubicin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Doxorubicin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Entellan®	Merck, Darmstadt
Eosin-G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
Humanes CD73 / NT5E Protein (His-tag)	Sino Biological, Peking (China)
Leupeptin	Sigma Aldrich, USA
Metafectene Pro	Biontexx, Planegg
MTT (Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid)	Sigma Aldrich, USA
NADH	Sigma Aldrich, USA
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, USA
OptiPrep™ Density Gradient Solution	Sigma Aldrich, USA
PageRuler Plus prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Pepstatin	Sigma Aldrich, USA
PMSF	Sigma Aldrich, USA
Proteaseinhibitor ULTRA Tabletten, EDTA-frei	Roche, Basel (Schweiz)
Protein Block serumfree	Dako, Japan
Pyruvat	Sigma Aldrich, USA

Rotiporese Gel 30 (30 % Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, USA
Xylol, Roti®-Histol	Carl Roth, Karlsruhe

#### 4.7 Plasmide

Plasmid	Bezugsstelle
Humanes CD73/NT5E cDNA Expressionsplasmid, C-His tag	Sino Biological, Peking (China)

#### 4.8 Kits

Kit	Hersteller
Malachitgrün-Phosphat-Assay Kit	Sigma Aldrich, USA
Plasmid Maxiprep kit DNA Kit	Metabion, Planegg
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA

#### 4.9 Software

Software	Hersteller
Microsoft® Word, Excel und Power Point 2011	Microsoft, USA
Living Image® 4.5	Perkin Elmer
FlowJo® 10.0.7	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., USA
Endnote® X7.2	Thomson Reuters, USA

## 4.10 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, stabile Expression des SV40 T-Antigens	Kulturmedium
293T/CD73	293T stabil transfiziert mit einem CD73-Expressionsplasmid	Kulturmedium
A375	Melanomzelllinie	Kulturmedium
A549	Lungenkarzinomzelllinie	Kulturmedium
Aspc-1	Pankreaskarzinomzelllinie	Kulturmedium
GBM10	Primäre Glioblastomzelllinie (Prof. Glaß, LMU)	GBM-Medium
GBM14	Primäre Glioblastomzelllinie (Prof. Glaß, LMU)	GBM-Medium
GBM20	Primäre Glioblastomzelllinie (Prof. Glaß, LMU)	GBM-Medium
GBM29	Primäre Glioblastomzelllinie (Prof. Glaß, LMU)	GBM-Medium
MDA-MB-231	Mammakarzinomzelllinie (Dr. Riganti, Universität Turin)	Kulturmedium
MDA-MB-231/mCherry/fLUC	Mammakarzinomzelllinie, transduziert mit mCherry + firefly Luciferase (AG Jeremias, HMGU)	Kulturmedium
OSU-CLL	CLL Linie (Dr. Deaglio, Universität Turin)	AIM V® Medium
T47-D	Mammakarzinomzelllinie	Kulturmedium
U138 MG	Glioblastomzelllinie	Kulturmedium
U373	Glioblastomzelllinie	Kulturmedium

#### 4.11 Medien und Zusätze

Material	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA 1x	GIBCO, Karlsruhe
Accutase® Solution	Sigma Aldrich, USA
ATP 100mM	Thermo Scientific, USA
B27® Supplement serum free (50x)	GIBCO, Karlsruhe
DMEM high Glucose	Sigma Aldrich, USA
DMEM/F12	GIBCO, Karlsruhe
DMEM/F12 Pulver	GIBCO, Karlsruhe
DPBS	Pan Biotech, Aidenbach
Fötales Kälberserum (FCS)	Bio Sell, Feucht
Human FGF-basic	PeproTech, USA
Hygromycin B	Invitrogen, Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
Recombinant human EGF	R&D Systems,
RPMI 1640	GIBCO, Karlsruhe

Kulturmedium	Bestandteile
Einfriermedium	90 %FCS, 10 % DMSO
Zellzähllösung	0,2 % Trypanblau (w/v), 0,1 % Na N <sub>3</sub> (w/v) in PBS
GBM-Einfriermedium	GBM-Medium, 5 % DMSO
GBM-Medium	500 ml DMEM/F12 + Glutamine, 10 ml B27® supplement (50x), 10 ng/ml FGF , 10 ng/ml EGF, 1x Pen/Strep
GBM-Medium ohne Bikarbonat	500 ml H <sub>2</sub> O, 6 g DMEM/F12 Pulver, 30 mM HEPES, pH 7,4
Kulturmedium	500 ml RPMI 1640, 1x Pen/Strep, 8 % FCS
Kulturmedium ohne Bikarbonat	500 ml H <sub>2</sub> O, 6 g DMEM high Glucose Pulver, 30 mM HEPES, pH 7,4

## **5 Methoden**

### **5.1 Proteinbiochemische Methoden**

#### **5.1.1 Herstellen von Zelllysaten**

Um Zelllysate zu erstellen wurden Zellen pelletiert, in DPBS gewaschen und anschließend in RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Dabei wurden ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l Puffer lysiert, für ca. 30 min auf Eis gelagert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 16.000x g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Assay (5.1.2.2) oder Bradford-Assay (5.1.2.1). Zelllysate wurden kurzzeitig bei -20 °C und langfristig bei -80 °C gelagert.

#### **5.1.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

##### **5.1.2.1 Bradford-Assay**

Um die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay zu bestimmen, wurde die Bradford Stocklösung 1:5 mit Wasser verdünnt eingesetzt. Nach Zugabe der Proteinprobe kam es zu einem Farbumschlag, welcher bei 595 nm an einem Photometer über eine Standardkurve aus bovinem Serumalbumin (BSA) quantifiziert wurde.

##### **5.1.2.2 BCA-Assay**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay erfolgte mit Hilfe des Pierce™ BCA-Protein-Assay Kit nach Herstellerangaben.

### 5.1.3 Bis/Tris-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Immunoblotting

Um Proteingemische aufzutrennen und zu analysieren wurde eine Bis/Tris-PAGE durchgeführt. Hierzu wurden die Proben mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer (1x Endkonzentration) versetzt und auf ein Volumen von 20 µl mit RIPA-Lysepuffer eingestellt. Alle Proben wurden anschließend bei 95 °C für 5 min gekocht und auf Eis abgekühlt.

Bis/Tris-Sammel- und Trenngele und Laufpuffer wurden wie in 4.2 beschrieben hergestellt. Es wurden je 20 µl Probe und 8 µl Größenstandard aufgetragen. Um die Proben im Sammelgel zu sammeln wurde eine konstante Stromstärke von 40 mA angelegt. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Stromstärke auf konstant 80 mA erhöht. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels „semi-dry Blot-System“ übertragen. Dabei wurden vor dem Elektrotransfer sowohl die Gel-Blottingpapiere, als auch die Membran und das Gel in Blotpuffer-Arbeitslösung befeuchtet und anschließend in den Blotter überführt. Der Transfer erfolgte bei konstanten 18 V für 40 min. Die Membran wurde im Folgenden für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 5 % Milchpulver in TBST blockiert. Alle Antikörper wurden ebenfalls in 5 % Milchpulver/TBST verdünnt eingesetzt. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST erfolgte die Inkubation mit speziesspezifischem, HRP-konjugiertem Zweitantikörper für maximal zwei Stunden bei RT. Nach mehrmaligem Waschen in TBST für 10 min wurde die Membran per Chemilumineszenz entwickelt. Dafür wurde die Membran in einer Entwicklerkassette mit der ECL-Arbeitslösung für ca. 2 min inkubiert. Das dabei entstehende Chemilumineszenzsignal wurde dann in einer Dunkelkammer mit unterschiedlichen Belichtungszeiten auf einen Röntgenfilm übertragen und dieser im Anschluss entwickelt.

#### 5.1.3.1 Dot Blot

Um die Proteine im nativen Zustand auf EV zu detektieren wurden 2 µl EV direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft. Zur Kontrolle wurde jeweils 1 µl Zelllysat der Zelllinie, aus welcher EV isoliert wurden, aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit 5 % Milchpulver in TBST blockiert und wie in 5.1.3 beschrieben mit Antikörpern inkubiert und entwickelt.



#### **5.1.4 Immunpräzipitation (IP) zur Identifikation der Spezifität primärer Hybridomüberstände**

Zur Identifikation der Spezifität primärer Hybridomüberstände wurde eine IP mit CNBr-Beads durchgeführt. Dieses Protokoll zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus, da die Antikörper aus Hybridomüberständen mithilfe anti-Subklassen-spezifischer Antikörper an die Beads gekoppelt werden. Alle Arbeitsschritte wurden mit kalten Lösungen und auf Eis durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und 800x g.

1 g CNBr Beads wurden in 10 ml 1 mM HCl gelöst und für 20 min bei RT zum Quellen gebracht. Anschließend wurden die Beads für 1 min abzentrifugiert und weitere 15 Mal mit 10 ml 1 mM HCl gewaschen.

Im nächsten Schritt folgte die Kopplung der anti-Subklassen spezifischen Antikörper anti-Ratte-IgG2a/2b/2c an die aktivierten Beads. Hierfür wurde 1 ml Beads in 1x Kopplungspuffer gewaschen. Zwei Milligramm anti-Subklassen spezifische Antikörper wurden in 3x Kopplungspuffer aufgenommen, mit PBS auf 1,4 ml aufgefüllt und mit den gewaschenen Beads vermischt. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei RT in einem Überkopfschüttler. Die Beads wurden anschließend zentrifugiert und in 5 ml 1x Kopplungspuffer gewaschen. Es folgte das Blockieren aller restlichen aktiven Gruppen. Dazu wurden die Beads in 5 ml 1 M Ethanolamin pH 8 für 2 Stunden bei RT in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden anschließend folgendermaßen in je 5 ml gewaschen: 3x in Waschpuffer, 3x in NaOAc Puffer, 3x in Waschpuffer, 3x in NaOAc Puffer und 3x in PBS. Die Beads wurden final in 2 ml PBS aufgenommen und konnten bei 4 °C gelagert werden.

Um Hybridomüberstände zu charakterisieren wurden 500 µl Überstand mit 60 µl anti-Subklassen spezifisch gekoppelten Beads über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden sie 3x in PBS gewaschen und mit 2 mg GBM20-Zelllysate in 500 µl vermengt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C in einem Überkopfschüttler. Danach wurden folgende Waschschrte durchgeführt: 1x in RIPA+ Puffer, 2x in PBS+ und 2x in PBS. Der Überstand wurde abgenommen, die Beads in 3x Laemmli-puffer resuspendiert und bei RT für 2-3 min inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000x g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und konnte für Western Blot- oder massenspektrometrische Analysen verwendet werden. Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Dr. Hauck der Abteilung *Research Unit Protein Science* am HMGU durchgeführt.

### **5.1.5 Bestimmung der CD73-Aktivität von löslichem, humanem CD73**

Um die CD73-Aktivität von löslichem rekombinantem CD73 zu prüfen, wurde rekombinantes Protein in Glukosepuffer gelöst. Je Ansatz wurde 1 ng/ $\mu$ l in Glukosepuffer eingesetzt. Falls Inhibitoren eingesetzt wurden, erfolgte eine Vorinkubation für ca. 30 min bei RT. Anschließend folgte die Zugabe des Substrats AMP mit einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M. Die enzymatische Reaktion erfolgte bei 37 °C für eine Stunde. Danach wurde die CD73-Aktivität über die Menge an entstandenem freiem Phosphat (Pi) bestimmt. Die Quantifizierung der Pi-Menge im Reaktionsansatz erfolgte mit Hilfe des Malachitgrün-Phosphat-Assay Kits nach Herstellerangaben.

## **5.2 Zellbiologische Methoden**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurde nach den geltenden S1- und S2-Vorschriften der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) gearbeitet. Alle Zelllinien wurden in den entsprechenden Kulturmedien bei 37 °C, 5 %-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre und atmosphärischem O<sub>2</sub>-Gehalt von 21 % kultiviert (Inkubation unter normoxischen Standardbedingungen). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten standardmäßig bei 300x g und 22 °C für 10 min.

### **5.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in entsprechendem Einfriermedium in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Es folgte die Langzeitlagerung in der Gasphase eines Stickstofflagersystems. Um Zellen aufzutauen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C für 3 min erwärmt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette resuspendiert und in 25 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in der gewünschten Zelldichte ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert.

### 5.2.2 Passagieren adhärenter Zellen

Um adhärenente Zellen zu passagieren, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Es folgte eine Trypsinbehandlung bei 37 °C für 3 min, um die Zellen von dem Kultivierungsgefäß abzulösen. Dies wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen je nach Bedarf ausgesät.

### 5.2.3 Passagieren semiadhärenter GBM-Linien

Manche primären GBM-Linien wuchsen semiadhärent. Hierbei befindet sich ein Teil der Zellen in Suspension, der andere Teil setzt sich auf dem Boden der Zellkulturflasche ab. Um semiadhärente GBM-Linien zu passagieren wurde der Kulturüberstand mit Zellen in Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Der adhärenente Teil der Zellen wurde für 3 min bei 37 °C mit 3-5 ml Accutase® behandelt und mit GBM-Kulturmedium abgespült. Die Zellsuspension wurde mit den Suspensionszellen vereint und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen je nach Bedarf ausgesät.

### 5.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden Zellen einer Einzelzellsuspension nach Bedarf mit Zellzähllösung verdünnt. Die Zählkammer wurde mit 10 µl der verdünnten Zellsuspension gefüllt und die Gesamtzellzahl nach folgender Formel bestimmt.

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{Summe 4 Großquadrate}}{4} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{10^4}{\text{ml}}$$

**Formel 1:** Berechnung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.

### 5.2.5 Kultivierung von Zellen als *hanging drop*-Sphäroidkulturen

Um Zellen als Sphäroide zu kultivieren, wurde die *hanging drop*-Methode angewendet. Dabei wurden Zellen in 20-30 µl Medium in unterschiedlichen Zellzahlen auf die Unterseite eines Deckels einer Zellkulturschale in einzelnen Tropfen pipettiert. Die Schale wurde mit PBS gefüllt und der Deckel wieder auf die Schale gesetzt. Dadurch entstanden *hanging drops*, in welchen Zellen sphäroidartige Strukturen bildeten. Die Sphäroide wurden für 2-3 Tage kultiviert und anschließend in Viabilitätsassays eingesetzt.

### 5.2.6 Stabile Transfektion von Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mittels Metafectene® Pro. Es wurden je Transfektionsansatz 6 µg Plasmid-DNA und 24 µl Metafectene® Pro verwendet. Die Selektion mit entsprechendem Selektionsmedium erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

### 5.2.7 Durchflusszytometrie

Um Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von Oberflächenantigenen zu analysieren, wurden Zellen zunächst in FACS-Puffer gewaschen. Pro Färbung wurden  $1-2 \cdot 10^5$  Zellen in 50 µl FACS-Puffer für 20 min auf Eis gefärbt. Nach der Färbung mit Primärantikörpern wurden die Zellen in DPBS gewaschen. Die Färbung mit fluorochrommarkierten Zweitantikörpern erfolgte ebenfalls in 50 µl FACS-Puffer für 20 min auf Eis. Die Zellen wurden danach in DPBS gewaschen und für die durchflusszytometrische Analyse in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Alle kommerziell erhältlichen Antikörper wurden nach Herstellerangaben verwendet. Hybridomüberstände wurden 1:5 bis 1:10 in FACS-Puffer verdünnt eingesetzt.

### 5.2.8 Isolierung von extrazellulären Vesikeln (EV) aus GBM20-Kulturüberstand und humanem Aszites

Um extrazelluläre Vesikel zu isolieren, wurden GBM20-Zellen bis zu einer hohen Zelldichte kultiviert. Insgesamt wurden mindestens 210 ml Kulturüberstand oder durch Gaze filtrierter Aszites für die Isolation der EV eingesetzt. Der Kulturüberstand bzw. Aszites wurde durch serielle Zentrifugation von Zellen und Zelldebris gereinigt (10 min 300x g, 20 min 5000x g). Der Überstand wurde anschließend durch einen 0,8 µm Filter filtriert und die EV für 2 h bei 4 °C und 100.000x g durch Ultrazentrifugation pelletiert. Dabei wurden SW28 oder SW32 Rotoren verwendet. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation wurde bis auf wenige Milliliter abgenommen und mit 500 µl PBS inkl. Proteaseinhibitor versetzt. Um pelletierte EV vorsichtig aus den Röhrchen abzulösen wurden sie auf Eis für mind. 30 min geschüttelt, anschließend in einem UZ-Röhrchen vereint und in PBS gewaschen (2 h bei 4 °C und 100.000x g). Die pelletierten EV wurden in einem Volumen von max. 1,2 ml aufgenommen und erneut in bei 100.000x g für 2 h bei 4 °C in einer Tischultrazentrifuge zentrifugiert. Die EV-Isolation wurde per Dot Blot auf die Vesikelmarker CD63 und CD81 analysiert und für weitere Versuche bei 4 °C gelagert.

#### 5.2.8.1 Dichtegradient zur Konzentration und Charakterisierung von EV

Um EV weiter zu charakterisieren und freie Proteine zu entfernen, wurden EV über einen diskontinuierlichen Iodixanolgradienten gereinigt. EV wurden mit 60 % OptiPrep™ Lösung inkl. Proteaseinhibitor in einem Verhältnis von 1:1,36 vermischt. Dadurch wurde eine OptiPrep™ Konzentration von 44 % erreicht. Dieser EV-OptiPrep™ -Mix wurde in ein 4 ml-Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert und mit 3,4 ml 30 % OptiPrep™ inkl. Proteaseinhibitor, sowie 600 µl PBS inkl. Proteaseinhibitor überschichtet. Es folgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 4 °C in einem SW60Ti Rotor bei 160.000x g für 4 h und 20 min oder über Nacht. Anschließend wurden von oben nach unten acht Fraktionen à 500 µl entnommen. Alle Fraktionen wurden in Dot Blots oder Western Blots auf vesikuläre Marker getestet. Zusätzlich wurde mittels Refraktometer die Dichte aller Fraktionen bestimmt, sowie die Partikelanzahl mittels „*Nanopartikel-Tracking-Analyse*“.

Anhand dieser Ergebnisse wurden alle Fraktionen, welche EV enthielten (meist Fraktionen zwei und drei) vereint und in 30 ml PBS durch Ultrazentrifugation gewaschen (100.000x g, 2 h, 4 °C). Die pelletierten, gereinigten EV wurden in max. 1,2 ml PBS inkl. Proteaseinhibitor aufgenommen und erneut bei 100.000x g für 2 h bei 4 °C in einer Tischultrazentrifuge konzentriert. Gereinigte EV wurden für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert.

#### 5.2.8.2 Bestimmung der Partikelanzahl mittels „*Nanopartikel-Tracking-Analyse*“ (NTA)

„*Nanopartikel-Tracking-Analyse*“ ist eine neuartige Methode um die Konzentration und Größe von Nanopartikeln in Lösungen zu bestimmen [126, 127]. Die Bestimmung der Konzentration isolierter Vesikel wurde mithilfe des ZetaView® durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über 102 nm Standardbeads. Die Vesikel wurden in unterschiedlichen Verdünnungen für die Messung eingesetzt (Kameraeinstellungen: Shutter 50, Sensitivität 70, 23 °C).

#### 5.2.9 Viabilitätsassay (MTT)

Um die Viabilität von Zellen zu bestimmen, wurde ein MTT-Assay angewendet. Zellen wurden hierfür in einer 96-Well Platte unter verschiedensten Bedingungen kultiviert. Sphäroide aus *hanging drop*-Kulturen wurden in eine 96-Well Platte überführt. Um die Viabilität zu bestimmen wurde MTT-Stocklösung (5 mg/ml) mit einer Endkonzentration von 500 µg/ml ins Kulturmedium gegeben. Nach einer Inkubation von 3-4 Stunden im Inkubator wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Lyselösung (10 % SDS in Wasser) resuspendiert und über Nacht lysiert. Es folgte die Messung der optischen Dichte OD bei 595 nm.

### 5.2.10 Zytotoxizitätsassay (LDH-Assay)

Die Zytotoxizität von Zytostatika wurde über den Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay bestimmt. In diesem Assay wurde sowohl die extrazelluläre, als auch die intrazelluläre LDH-Aktivität bestimmt. Das Verhältnis beider Werte gibt Aussage über die Zytotoxizität. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde der Verbrauch an NADH über die Zeit verfolgt. Dies geschah durch eine photometrische Messung bei 340 nm.

Dafür wurden Zellen in einer 6-Well Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Die Inkubation mit zytotoxischen Stimuli erfolgte für 48 Stunden. Zur Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und bei 14.000x g für 30 s zentrifugiert. Für die Analyse der intrazellulären LDH-Aktivität wurden die Zellen anschließend mit PBS gewaschen und trypsiniert. Das Zellpellet wurde in je 200 µl TRAP-Puffer resuspendiert und sonifiziert. Die Proteinmenge des Zellkulturüberstandes, als auch der lysierten Zellen wurde mithilfe des Pierce™-BCA-Protein-Assay Kits bestimmt. Je 5 µl des Zelllysats und 50 µl des Zellkulturüberstandes wurden in den Assay eingesetzt. Je Ansatz wurden 250 µl LDH-Reaktionspuffer zugegeben und bei 37 °C für 6 min in einem Plattenphotometer inkubiert. Dabei erfolgte alle 30 s eine OD-Messung bei 340 nm. Aus dieser Kinetik wurde die Reaktionskinetik und anschließend mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Reaktionsgeschwindigkeit der NADH-Oxidation durch LDH pro Minute berechnet (Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für NADH = 9,31 dAbs/µmol/min). Es wurde auf die eingesetzte Proteinmenge normalisiert. Die Werte der extrazellulären LDH-Aktivität wurden als Anteil der gesamten LDH-Aktivität (intra- plus extrazelluläre LDH-Aktivität) angegeben.

### 5.2.11 Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Chemotherapeutika

Die hier verwendeten Chemotherapeutika Doxorubicin und Daunorubicin können durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden. Um die intrazelluläre Konzentration dieser Chemotherapeutika zu bestimmen wurden Zellen in einer 6-Well Platte ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin und Daunorubicin versetzt. Falls zusätzlich Antikörper eingesetzt wurden, wurden diese vor Zugabe der Chemotherapeutika zu den Zellen gegeben und 20 min vorinkubiert. Nach Zugabe der Chemotherapeutika wurden die Zellen für 48 h inkubiert.

Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen geerntet. Das Zellpellet wurde in ca. 400 µl EtOH/HCl 0,3 N (1:1 v/v) resuspendiert und sonifiziert. Die Proteinmenge wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits bestimmt. Je 300 µl Probe wurden in eine schwarze 96-Well Platte überführt und in einem Plattenfluorometer mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt. Die Fluoreszenzemission wurde bei 553 nm gemessen. Die Fluoreszenzwerte wurden durch eine Standardreihe quantifiziert und die Ergebnisse auf die eingesetzte zelluläre Proteinmenge normalisiert.

#### **5.2.12 P-Glykoprotein-Aktivitätsassay**

Während der enzymatischen Aktivität von P-Glykoprotein (P-GP) wird ATP verbraucht und in ADP und Pi umgesetzt. Die Aktivität von P-GP kann deshalb über die Quantifizierung des freigesetzten Pi bestimmt werden. Dies geschieht auf isolierten Membranfraktionen [128].

Dazu wurden adhärente Zellen in 10 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Sie wurden mit einem Zellschaber vorsichtig von der Zellkulturschale gelöst und pelletiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis mit kalten Lösungen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Ringerlösung plus 500 µl Lysepuffer aufgenommen und sonifiziert. Die Proben wurden bei 300x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert um größere Zellfragmente zu entfernen. Der Überstand wurde auf 1 ml Saccharosepuffer gegeben und alles für 10 min bei 14.000x g und 4 °C zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde von oben 1 ml abgenommen und verworfen. Der Rest wurde resuspendiert, in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (4 ml) überführt und mit 3 ml Zentrifugationspuffer überschichtet. Es folgte ein Ultrazentrifugationsschritt für 45 min und 100.000x g bei 4 °C um die Membranfraktionen zu pelletieren. Der Überstand wurde nach der Ultrazentrifugation abgenommen und die pelletierten Membranfraktionen in ca. 300 µl Zentrifugationspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben erneut sonifiziert. Mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits wurde von jeder Probe der Proteingehalt nach Herstellerangaben bestimmt.



Um die P-GP-Aktivität auf den gereinigten Membranfraktionen zu bestimmen wurden 50 µl der Fraktionen mit 50 µl Reaktionspuffer in eine 96-Well Platte überführt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Als Leerwert diente 500 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Nach der Inkubation wurden je Well 200 µl Stoppuffer zugegeben und die Platte bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Messung bei 620 nm. Die Phosphatmenge wurde anhand einer Standardkurve quantifiziert und wurde auf die Menge an eingesetztem, zellulärem Protein normalisiert.

### 5.2.13 Bestimmung der CD73-Aktivität auf Zellen

Da CD73 AMP in Adenosin und freies Phosphat (Pi) spaltet, korreliert die Pi-Konzentration direkt mit der Enzymaktivität. Um die CD73-Aktivität auf Zellen zu bestimmen, war es deshalb wichtig phosphatfrei zu arbeiten. Adhärenente Zellen wurden bis zu ca. 70 % Konfluenz in einer 24-Well Platte kultiviert. Die Zellen wurden 3x mit Glukosepuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 200 µl Glukosepuffer mit einer Endkonzentration von 1 mM AMP (Reaktionsmix). Falls die CD73-Aktivität inhibiert werden sollte, wurden die Inhibitoren entweder vor Zugabe von AMP (Inkubation für 20 min) oder zeitgleich im Reaktionsmix zugegeben. Hierbei war es wichtig, dass alle Inhibitoren in Pi-freien Medien zugegeben wurden. Der Inhibitor APCP wurde in HEPES- oder Glukosepuffer, der Antikörper 22E6 in Glycinpuffer eingesetzt. Zellen wurden mit AMP für mindestens 30 min im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Pi-Bestimmung im Reaktionsmix.

#### 5.2.13.1 Bestimmung der Phosphatkonzentration

Für die Bestimmung der Pi-Konzentration mittels Molybdänblau-Assay wurden 100 µl des Reaktionsmix von den Zellen abgenommen und in eine 96-Well Platte überführt. Anschließend wurden 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 50 µl Reaktionspuffer zugegeben. Die Platte wurde bei RT für 30 min inkubiert. Es folgte die Messung der OD bei 820 nm. Um die Pi-Konzentration zu bestimmen wurde die OD<sub>820</sub> mittels einer Pi-Standardkurve quantifiziert. Der Molybdänblau-Assay wurde für Pi-Konzentrationen über 50 µM durchgeführt. Für geringere Pi-Konzentrationen wurde der Malachitgrün-Assay zur Pi-Bestimmung verwendet.

Dabei wurden 80 µl des Reaktionsmix von den Zellen in eine 96-Well Platte überführt. Die Bestimmung der Pi-Konzentration erfolgte nach Herstellerangaben des Malachitgrün-Phosphat-Assay Kits.

#### 5.2.13.2 Bestimmung der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentration

Die Bestimmung der AMP- und Adenosinkonzentration eines Reaktionsmixes von Zellen wurde von Dr. Deaglio der Universität Turin mittels HPLC-Analyse durchgeführt [129].

### 5.3 Immunhistologie

#### 5.3.1 Anfertigen von Kryoschnitten aus präparierten murinen Gehirnen

Um Kryoschnitte aus murinen Gehirnen anzufertigen, wurden die fixierten und entwässerten Gehirne auf Trockeneis in Tissue-Tek® eingefroren. Mit einem Mikrotom wurden Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 40 µm angefertigt und diese in einer 24-Well Platte in Kryolösung bei -20 °C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

##### 5.3.1.1 H&E-Färbung von Kryoschnitten

Die Schnitte wurden aufgetaut, aus der Kryolösung entnommen und 3 x in PBS für je fünf Minuten in Netzeinsätzen für 12-Well Platten gewaschen. Anschließend wurden sie auf Objektträger aufgezogen und für mindestens zwei Stunden getrocknet. Die Färbung wurde nach folgendem Schema durchgeführt: 30 s 99,8 % Ethanol, 5 min Hämalun, 5 min laufendes Leitungswasser, 10 s Eosin, kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser, 20 s 70 % Ethanol, 1 min 96 % Ethanol, 1 min 99,8 % Ethanol, 1 min Xylol und nochmals 1 min in frisches Xylol. Die Schnitte wurden anschließend mit Entellan® eingedeckt.

### 5.3.1.2 Immunfärbungen von Kryoschnitten

Alle Färbungen wurden in einem Netzeinsatz für 12-Well Platten in einem Volumen von 500 µl durchgeführt. Alle Antikörper wurden in Antibody-Diluent verdünnt eingesetzt. Die Schnitte wurden aufgetaut, in Netzeinsätze für 12-Well Platten überführt und 3x für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach folgte eine Inkubation für 10 min in Peroxidaseblock mit anschließendem Waschen in PBS für 5 min (3x). Die Schnitte wurden 1 h mit Protein Block inkubiert und danach in Antikörperlösung mit Primärantikörper überführt. Die Färbung mit Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Danach wurde 3x mit PBS für fünf min gewaschen und die Schnitte anschließend für mindestens zwei Stunden bei RT mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde einmal in PBS und einmal in 0,05 M Tris pH 7,6 gewaschen. Für die nachfolgende DAB-Färbung wurde je 1 ml DAB Substrat Puffer mit einem Tropfen DAB Substrat vermischt und die Schnitte bis zur gewünschten Farbtintensität entwickelt. Nach der Färbung wurden die Schnitte 1x in 0,05 M Tris pH 7,6 und 2x in PBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden nun entweder getrocknet und nach 5.3.1.1 mit Hämalaun gegengefärbt oder direkt nass mit Aquatex® eingedeckt.

## 5.4 Tierexperimentelles Arbeiten

Alle Arbeiten an Tieren erfolgten nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung der Regierung von Oberbayern.

Die Haltung immunsupprimierter Mäuse erfolgte in pathogenfreier Umgebung in IVC-Käfigen unter geregelter Temperatur- und Luftversorgung, sowie 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, artgerechter Umsetzung und Fütterung. Pro Käfig wurden maximal vier Tiere gehalten.

### 5.4.1 Immunisierung von Ratten und Generierung von Hybridomen

Die Immunisierung von Ratten sowie die Hybridomzellkultur wurde von Dr. Regina Feederle und der Arbeitsgruppe „Monoklonale Antikörper Core Facility“ des Helmholtz-Zentrums München durchgeführt.

Für die Immunisierung von Wistar Ratten wurden je 10 µg EV verwendet, welche nach 5.2.8 isoliert und charakterisiert wurden. Es wurden zwei Ratten unter Zugabe von CpG-2006 und „*Incomplete*-Freund-Adjuvans“ immunisiert. Ratte 1 wurde nach 9 Wochen, Ratte 2 nach 15 Wochen erneut mit 10 µg EV und „*Incomplete* –Freund-Adjuvans“ immunisiert. Nach jeweils zwei weiteren Wochen folgte die Entnahme der Milzen. Mit den daraus isolierten B-Zellen erfolgte die Etablierung von stabilen Hybridomklonen nach Kohler und Milstein [115].

#### 5.4.2 Biolumineszenzbasierte Bildgebung

Durch biolumineszenzbasierte Bildgebung kann die Tumorlast von Mäusen am lebenden Tier gemessen werden.

Da alle verwendeten Tumorzellen das Enzym *firefly*-Luziferase exprimieren, konnte durch Gabe des Substrats Luciferin (150 mg/kg *i.p.*) ein tumorspezifisches Lumineszenzsignal detektiert werden. Die Messung erfolgte an einem *IVIS II Imaging* Gerät. Dazu wurden alle Tiere unter Isofluran-Narkose gesetzt. Das gemessene Lumineszenzsignal wurde mithilfe der Living Image Software quantifiziert.

#### 5.4.3 Hochauflösende Ganzkörpermikroskopie von Mäusen

Die dreidimensionale hochauflösende Visualisierung von fluoreszenzmarkierten Tumorzellen erfolgte in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Ertürk des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung der LMU. Alle Mäuse wurden dafür transkardial perfundiert und durch die Methode 3DISCO für die hochauflösende Mikroskopie vorbereitet [130-133]. Um das endogene mCherry-Signal der Tumorzellen zu verstärken, wurden mCherry-spezifische Einzeldomänenantikörper eingesetzt, die mit starken Fluorochromen, wie Alexa Fluor® gekoppelt waren. Die Aufnahmen erfolgten mithilfe eines hochauflösenden *Laser-scanning* Lichtscheibenfluoreszenzmikroskops.

## 5.5 Statistik

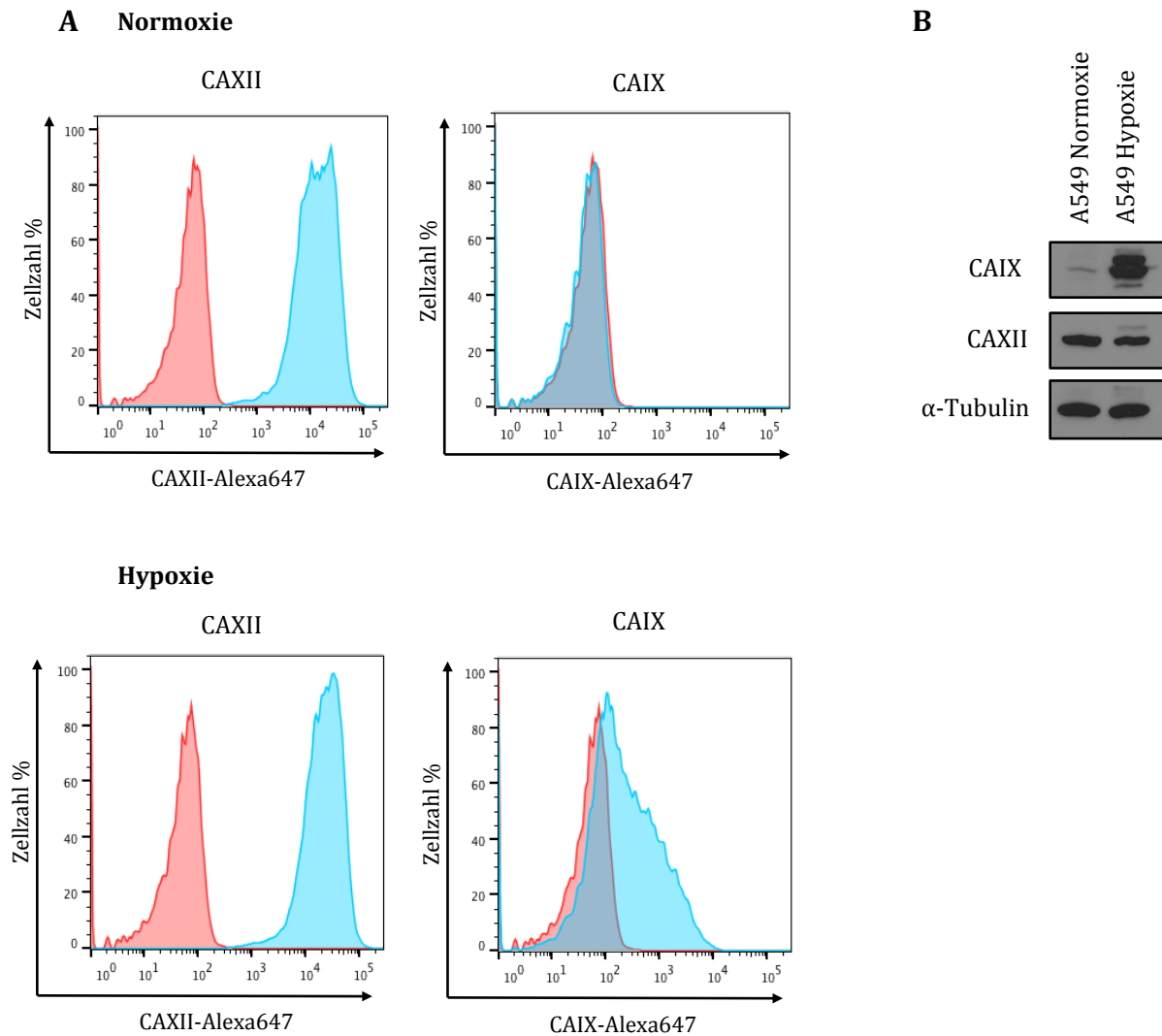
Alle Versuche wurden mindestens in zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dabei wurden immer mindestens drei biologische Replikate angesetzt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und statistische Signifikanz wurde mithilfe des Programmes GraphPad Prism 6 berechnet. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte über einen zweiseitigen t-Test mit 95 % Konfidenzintervall. Sie wurde in Form von p-Werten angegeben. Ein Stern wurde dabei für einen p-Wert  $\leq 0,05$ , zwei Sterne für einen p-Wert  $< 0,01$ , drei Sterne für  $p < 0,001$  und vier Sterne für  $p < 0,0001$  verwendet.

## 6 Ergebnisse CAXII und 6A10

### 6.1 Analyse des additiven, antitumoralen Effekts von 6A10 und MSC-8

Der monoklonale Antikörper 6A10 bindet und inhibiert die Carboanhydrase XII (CAXII) [59]. Diese spezifische Inhibierung der CAXII mit 6A10 führte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* zu einem reduzierten Wachstum von Tumorzellen [58, 59]. Neben CAXII ist auch die Carboanhydrase IX (CAIX) tumorassoziiert. Beide Carboanhydrasen sind essentiell an der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes von Tumorzellen beteiligt [26, 134].

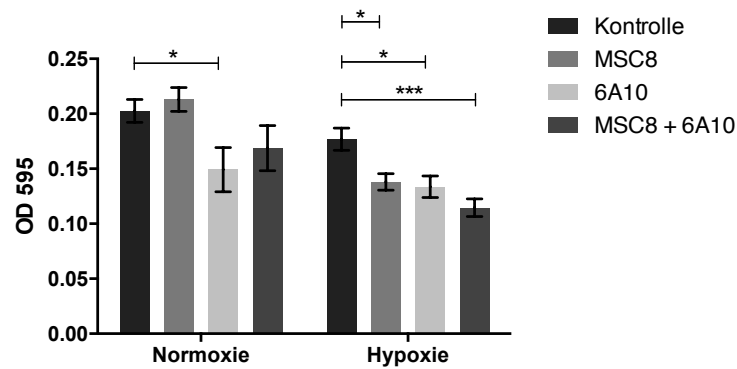
In dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob eine simultane Inhibierung von CAXII und CAIX durch inhibierende Antikörper den antitumoralen Effekt verstärkt. Um dies zu untersuchen, wurde zusätzlich zu 6A10 der CAIX inhibierende Antikörper MSC-8 verwendet, welcher von Prof. Renner (Universität Basel) zur Verfügung gestellt wurde [135]. Um den additiven Effekt dieser beiden Antikörper *in vitro* zu untersuchen, wurde die Lungenkarzinom-Zelllinie A549 verwendet. Diese Zelllinie exprimiert unter normoxischen Bedingungen nur CAXII, unter Inkubation bei Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>, 48 h) wird jedoch die Expression von CAIX induziert [58]. Die Expression beider Carboanhydrasen wurde zunächst durch Durchflusszytometrie erneut analysiert und per Western Blot bestätigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Expressionsanalyse von CAXII und CAIX auf A549-Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. **A:** Durchflusszytometrische Analyse der CAXII Expression. CAXII Färbung mit dem Antikörper 6A10, CAIX Färbung mit dem Antikörper 10E12 (blau), Isotypkontrolle (rot) jeweils nach Inkubation unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. **B:** Western Blot Analyse der CAXII- und CAIX-Expression von A549-Zellen.  $\alpha$ -Tubulin diene als Ladekontrolle.

Um den Effekt beider Antikörper auf das Wachstum von A549 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in bikarbonatfreiem Kulturmedium inkubiert. Dadurch konnten Kompensationseffekte des Bikarbonats aus normalem Kulturmedium auf die zelluläre pH-Regulierung minimiert werden.

A549-Zellen wurden als Sphäroide nach 5.2.5 mit  $8 \cdot 10^3$  Zellen in je 20  $\mu$ l Kulturmedium kultiviert. Alle Antikörper wurden in einer Endkonzentration von 25  $\mu$ g/ml eingesetzt. Die Sphäroide wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für drei Tage kultiviert und anschließend in einem Viabilitätsassay analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 abgebildet.

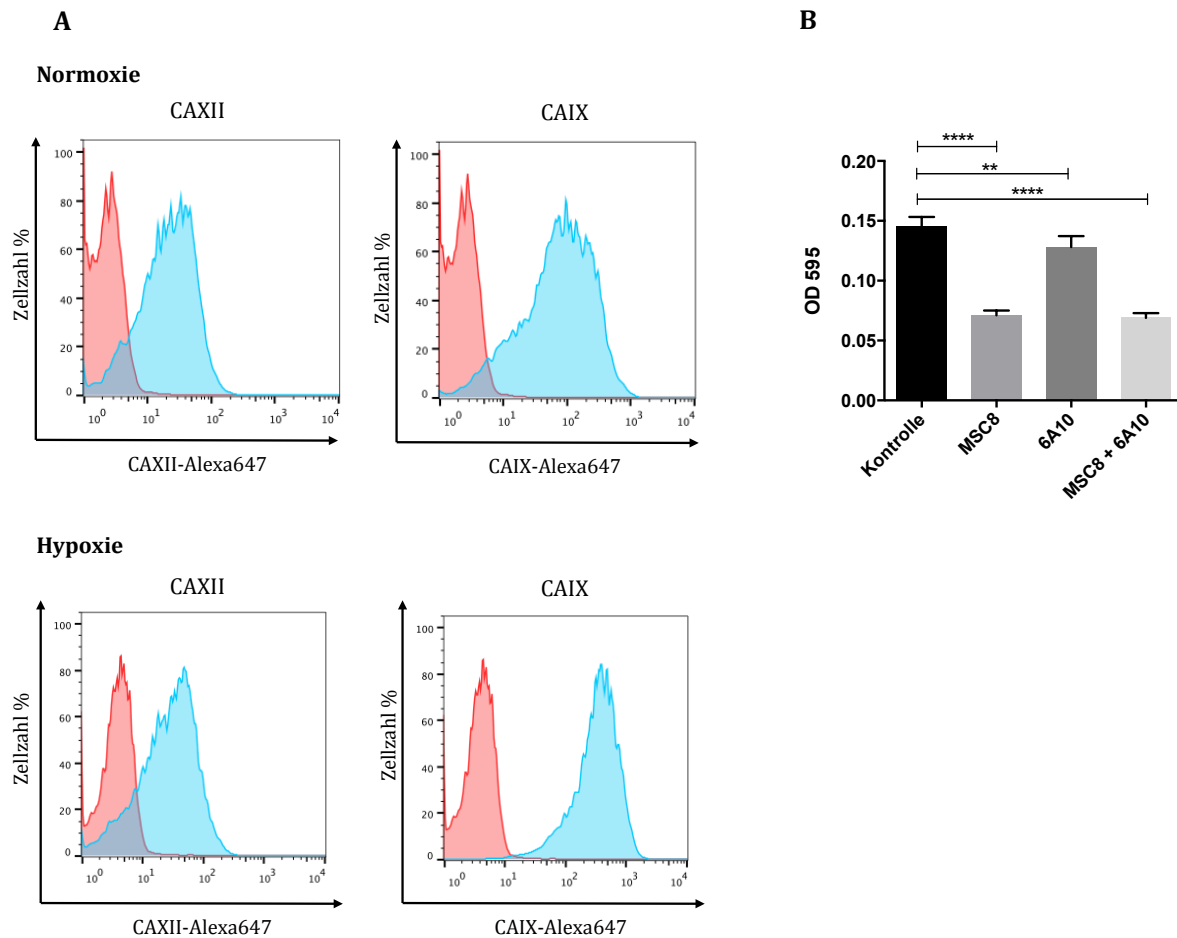


**Abbildung 5:** Viabilitätsassay auf A549-Sphäroiden. A549-Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie als Sphäroide unter Zugabe von je 25 µg/ml 6A10 und MSC-8 kultiviert. Die Viabilität wurde durch einen MTT-Assay bestimmt. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus biologischen Triplikaten. Sterne stellen die jeweilige statistische Signifikanz dar.

Die Auswertung des Viabilitätsassays zeigte, dass beide Antikörper einen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Die Inkubation mit 6A10 führte unter normoxischen Bedingungen zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Dies konnte jedoch mit MSC-8 erst unter hypoxischen Kulturbedingungen erreicht werden. Die Zellviabilität wurde durch die Inkubation mit einer Kombination aus beiden Antikörpern am stärksten reduziert (Abbildung 5).

Um den additiven Effekt von 6A10 und MSC-8 in einem anderen Modell genauer zu untersuchen, wurde die Pankreaskarzinom-Linie Aspc-1 gewählt. Diese Zelllinie exprimiert sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie CAXII und CAIX (Abbildung 6).





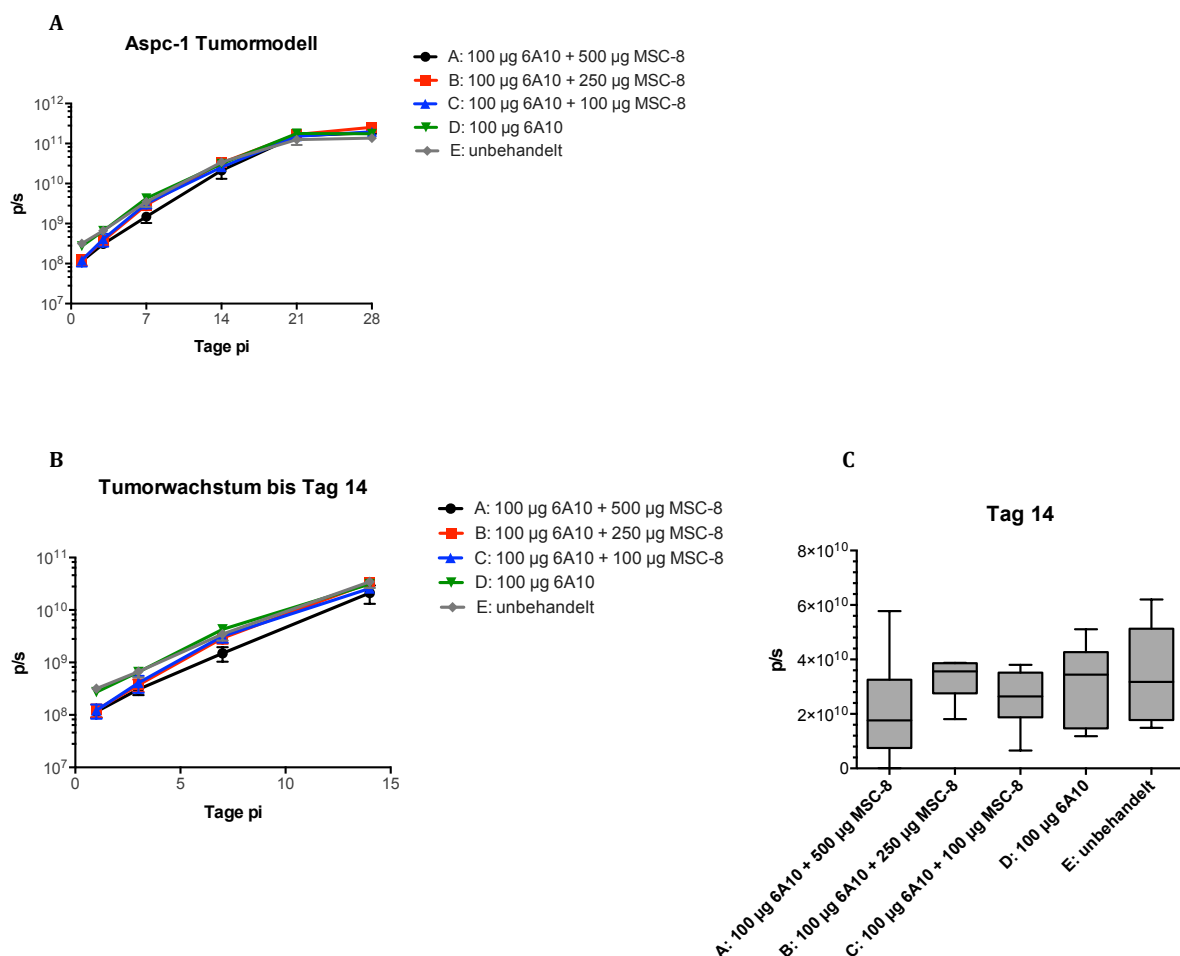
**Abbildung 6:** Expressionsanalyse von CAXII und CAIX auf Aspc-1-Zellen und Viabilitätsassay mit Aspc-1-Sphäroiden. **A:** Durchflusszytometrische Analyse der CAXII und CAIX Expression unter Normoxie und Hypoxie (rot: Isotypkontrolle, blau: CAXII-Färbung mit 6A10 bzw. CAIX-Färbung mit 10E12). Zellen wurden für 48 Stunden unter 21 % bzw. 1 % O<sub>2</sub> inkubiert. **B:** Viabilitätsassay aus Aspc-1-Sphäroidkulturen unter Normoxie mit je 25 µg/ml Antikörper. Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus biologischen Triplikaten dargestellt. Sterne markieren die jeweilige statistische Signifikanz.

Die Analyse der Zellviabilität von Aspc-1-Sphäroidkulturen (Abbildung 6 B) zeigte, dass die Inkubation mit MSC-8 und 6A10 jeweils die Zellviabilität reduzieren. Durch die Kombination beider Antikörper konnte dies jedoch nicht weiter verringert werden. Ein additiver Effekt konnte somit *in vitro* auf Aspc-1-Zellen nicht bestätigt werden.

Um den antitumoralen Effekt beider Antikörper auf Aspc-1-Zellen *in vivo* zu untersuchen wurde ein *residual disease* Mausmodell gewählt. Um das Tumorwachstum durch Biolumineszenzmessungen *in vivo* verfolgen zu können, wurden Aspc-1-Zellen lentiviral mit der *firefly* Luziferase (fLUC) und mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) transduziert [136]. Es wurden immunsupprimierte NSG-Mäuse (NOD-scid IL2Rγ<sup>-/-</sup>) verwendet.

Je Tier wurden  $5 \cdot 10^4$  Aspc-1/GFP/FLUC Zellen in RPMI intraperitoneal (*i.p.*) gespritzt. Anschließend erfolgte einmal wöchentlich die Applikation der Antikörper *i.p.* Dabei wurde 6A10 mit einer konstanten Konzentration von 100  $\mu\text{g}$  pro Tier eingesetzt. Dies entsprach der bereits etablierten therapeutischen Dosis [58]. Die effektive Konzentration von MSC-8 wurde in folgendem Experiment bestimmt. Dazu wurde MSC-8 mit 500  $\mu\text{g}$ , 250  $\mu\text{g}$  und 100  $\mu\text{g}$  pro Tier eingesetzt. Pro Gruppe wurden 5 Tiere verwendet. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse, sowie Tiere die nur 6A10 appliziert bekamen.

Das Tumorwachstum wurde wöchentlich durch Biolumineszenzmessung verfolgt. Der Versuch wurde nach 28 Tagen beendet, da einige Mäuse Symptome der Abbruchkriterien zeigten. Die Ergebnisse des Tiermodells sind in Abbildung 7 dargestellt.

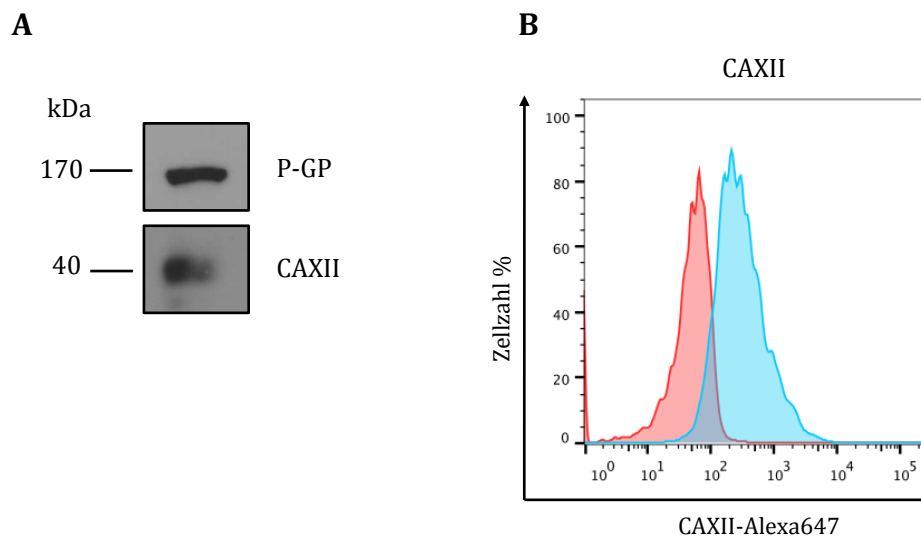


**Abbildung 7:** Ergebnisse des Aspc-1-Tiermodells. Es sind Daten der Biolumineszenzmessungen in Photonen pro Sekunde (p/s) dargestellt. **A:** Verlauf des Tumorwachstums bis Tag 28 (Versuchsende). **B:** Verlauf des Tumorwachstums bis Tag 14. **C:** Biolumineszenzdaten an Tag 14. Daten sind als Boxplots mit Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt.

Die Kombinationstherapie aus 6A10 und MSC-8 zeigte in diesem Tiermodell auf Aspc-1-Zellen *in vivo* ebenfalls keinen additiven antitumoralen Effekt. Die Kombination von 6A10 und 500 µg MSC-8 führte zu einer minimalen Reduktion des Tumorwachstums bis Tag 14 (Abbildung 7 B, C). Dieser Effekt konnte jedoch über den weiteren Versuchsverlauf nicht mehr detektiert werden (Abbildung 7 A). Die Behandlung mit 6A10 war in diesem Tiermodell ebenfalls nicht erfolgreich.

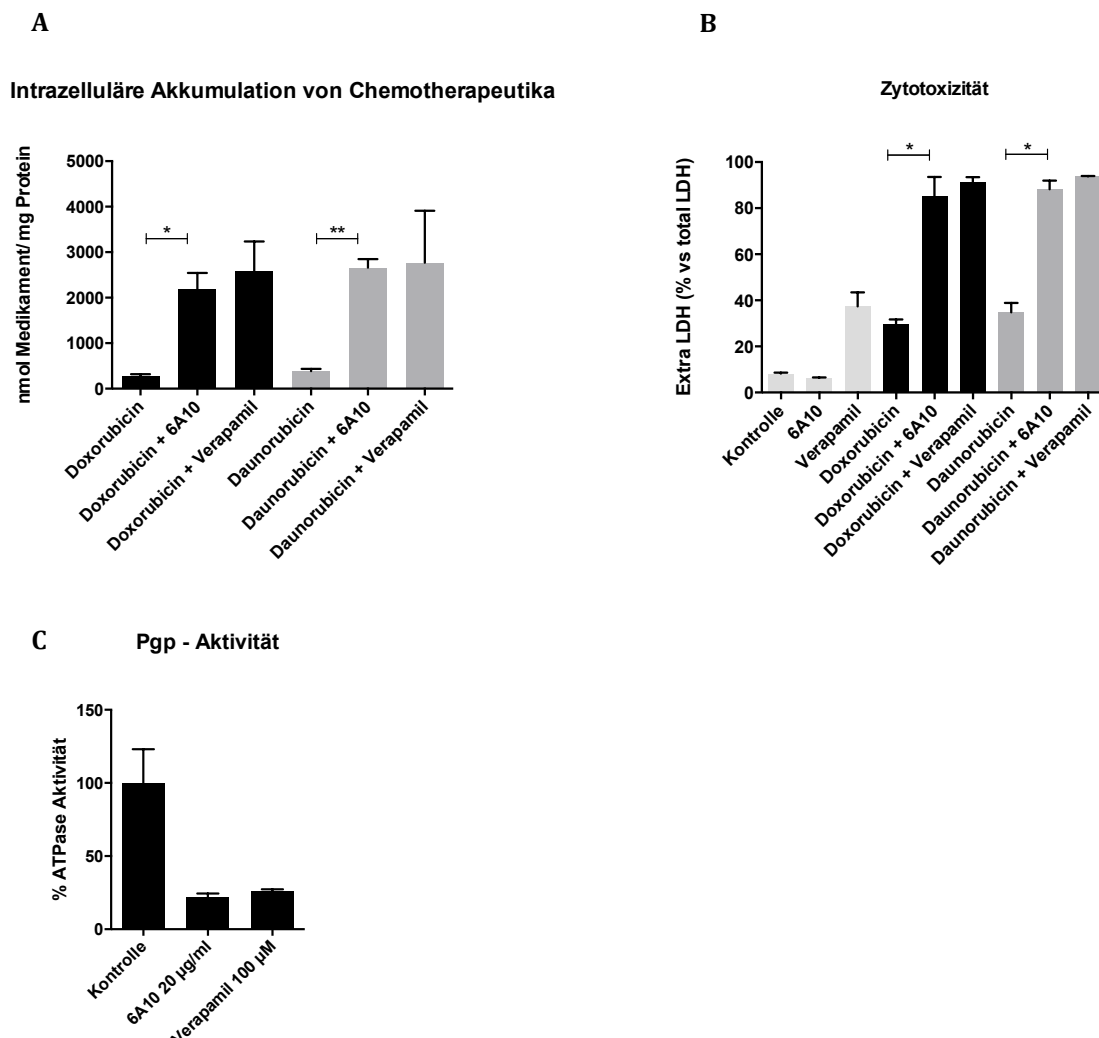
## 6.2 Einfluss von 6A10 auf Chemoresistenz *in vitro*

Riganti *et al.* zeigten, dass CAXII in Zusammenhang mit P-Glykoprotein (P-GP) vermittelter Chemoresistenz von Tumorzellen steht [62]. Im Folgenden sollte daher der Effekt der spezifischen Blockierung von CAXII durch 6A10 auf chemoresistenten Zellen untersucht werden. Als Modelllinie wurde die chemoresistente Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 verwendet, welche sowohl CAXII, als auch P-GP exprimiert (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Expression von CAXII und P-GP auf MDA-MB-231-Zellen. **A:** Western Blot Analyse der P-GP- und CAXII-Expression. **B:** Durchflusszytometrische Analyse der CAXII-Expression. Blau: CAXII-Färbung mit 6A10, rot: Isotypkontrolle.

Um den Effekt von 6A10 auf chemoresistente MDA-MB-231-Zellen zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Akkumulation und der zytotoxische Effekt der Anthrazykline Doxorubicin und Daunorubicin analysiert. Als Kontrolle diente dabei der chemische P-GP-Inhibitor Verapamil. Zellen wurden dafür mit 6A10 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Verapamil (75  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt und 48 Stunden mit Chemotherapeutika (5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Danach folgte die Bestimmung der intrazellulären Akkumulation der Anthrazykline sowie der Zytotoxizitätsassay nach 5.2.10 und 5.2.11. Des Weiteren wurde die Aktivität von P-GP unter Blockierung der CAXII durch 6A10 analysiert (5.2.12). Diese Analysen entstanden in Kooperation mit Dr. Riganti (Abteilung für Onkologie, Universität Turin) und wurden von mir während eines Forschungsaufenthalts in Turin durchgeführt (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Effekt von 6A10 auf chemoresistente MDA-MB-231-Zellen. Diese wurden unter Zugabe von 6A10 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Verapamil (75  $\mu\text{M}$ ) für 48 Stunden mit Doxorubicin oder Daunorubicin (je 5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. **A:** Intrazelluläre Akkumulation von Doxorubicin und Daunorubicin. **B:** Zytotoxizitätsanalyse mittels LDH-Assay. **C:** P-GP-Aktivitäts-Assay auf isolierten Membranfraktionen von MDA-MB-231 Zellen unter Zugabe von 6A10 bzw. Verapamil. Es sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichung aus biologischen Triplikaten dargestellt. Sterne markieren die jeweilige statistische Signifikanz.

Abbildung 9 zeigt deutlich, dass die Blockierung der CAXII durch 6A10 zu einer Sensitivierung chemoresistenter Zellen führte. Die intrazelluläre Akkumulation von Doxorubicin und Daunorubicin wurde durch Zugabe von 6A10 signifikant gesteigert (A). Dadurch erhöhte sich die Zytotoxizität (B). Alle Effekte sind mit dem chemischen P-GP-Inhibitor vergleichbar. Zusätzlich konnte ein direkter Effekt von 6A10 auf die Aktivität von P-GP gemessen werden (C).

### **6.3 Entwicklung eines orthotopen Brustkrebsmodells zur Untersuchung des Einflusses von 6A10 auf die Chemoresistenz *in vivo***

Da vorherige *in vitro* Daten einen deutlichen Effekt des 6A10-Antikörpers auf chemoresistente Zellen zeigten (Abbildung 9), wurde im Folgenden ein orthotopes Brustkrebs-Mausmodell entwickelt, um diesen Effekt auch *in vivo* detaillierter zu analysieren. Um das Wachstum transplanteder Tumorzellen durch biolumineszenzbasierte Bildgebung detektieren zu können, wurden MDA-MB-231 Zellen mit mCherry und *firefly*-Luziferase transduziert [136] (5.4.2). Alle transduzierten Zellen wurden mithilfe des Fluoreszenzmarkers mCherry sortiert, um eine einheitliche Zellpopulation zu erhalten.

Für die folgenden Experimente wurden immunsupprimierte NSG-Mäuse (NOD-scid IL2R $\gamma^{-/-}$ ) verwendet. Da es sich um ein orthotopes Brustkrebsmodell handelte, erfolgte die Zellinjektion der Tumorzellen direkt in das linke inguinale Brustfettpolster.

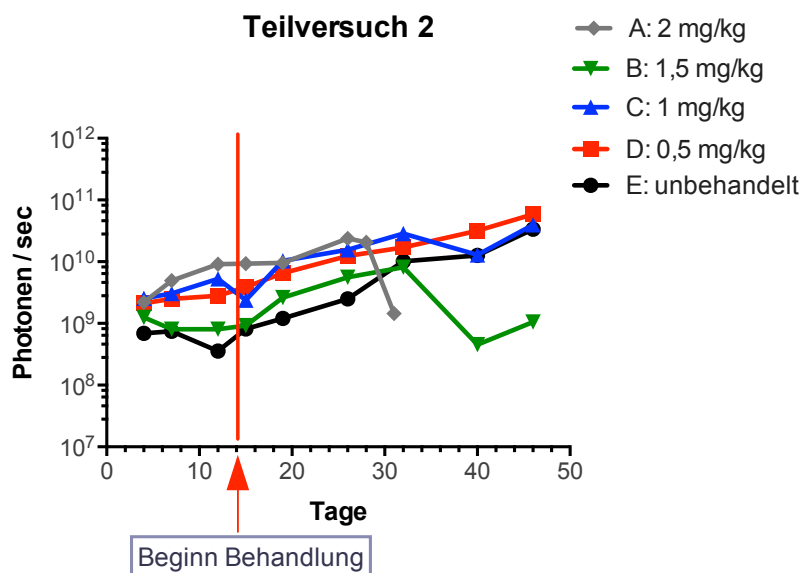
In einem ersten Vorversuch wurde zunächst getestet, welche Zellzahl für ein optimales Tumorwachstum appliziert werden musste. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass der Haupttumor im Brustfett anwuchs, die Mäuse aber nicht zu schnell Krankheitssymptome aufwiesen. Hierbei erwies sich eine applizierte Zellzahl von  $2 \cdot 10^6$  Zellen als optimal (Daten nicht gezeigt.)

Nachdem die optimale Zellzahl definiert war, wurde in einem zweiten Teilversuch die zu applizierende Dosis an Doxorubicin bestimmt. Hierbei war es wichtig, dass das Tumorwachstum durch Doxorubicin nicht vollständig verhindert wurde, sondern eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wurde.

Somit blieb der chemoresistente Phänotyp der Brustkrebszellen erhalten und es sollte möglich sein, eventuelle Effekte des 6A10-Antikörpers beobachten zu können. Des Weiteren könnte eine zu hohe Dosis an Doxorubicin zu starke Nebenwirkungen hervorrufen. Für den zweiten Teilversuch wurden deshalb  $2 \cdot 10^6$  MDA-MB-231/mCherry/fLUC Zellen injiziert und das Tumorstadium zweimal wöchentlich durch biolumineszenzbasierte Bildgebung verfolgt. 14 Tage nach Zellinjektion wurden folgende Gruppen à fünf Tiere gebildet und die Behandlung mit unterschiedlichen Dosen Doxorubicin zweimal wöchentlich *i.v.* begonnen:

- A: 2 mg Doxorubicin/kg Körpergewicht
- B: 1,5 mg Doxorubicin/kg Körpergewicht
- C: 1 mg Doxorubicin/kg Körpergewicht
- D: 0,5 mg Doxorubicin/kg Körpergewicht
- E: unbehandelte Tiere

Das Tumorstadium wurde weiterhin zweimal wöchentlich durch biolumineszenzbasierte Bildgebung analysiert. Nach 46 Tagen wurde der Versuch beendet. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse des zweiten Teilversuchs.



**Abbildung 10:** Dosisfindung von Doxorubicin in einem orthotopen Brustkrebsmodell. Je Tier wurden  $2 \cdot 10^6$  MDA-MB-231/mCherry/fLUC Zellen in das linke inguinale Brustfettpolster injiziert. 14 Tage nach Zellinjektion wurde die Behandlung mit unterschiedlichen Doxorubicindosen zweimal wöchentlich *i.v.* begonnen. Das Tumorstadium wurde zweimal wöchentlich durch biolumineszenzbasierte Bildgebung verfolgt. Es sind die Mittelwerte der Messungen von je fünf Tieren pro Gruppe über einen Zeitraum von 46 Tagen angegeben.

Obwohl es Unterschiede in der Tumorlast zwischen den einzelnen Gruppen zu Beginn der Behandlung gab, entsprach der Verlauf des Tumorwachstums unter Doxorubicin den Erwartungen. Es ist deutlich erkennbar, dass die verwendete Zelllinie therapieresistent war, da jede der applizierten Doxorubicindosen kaum Einfluss auf das Tumorwachstum hatte. Die Tiere, die mit der höchsten Dosis Doxorubicin behandelt worden waren (2 mg/kg Körpergewicht), zeigten nach ca. 30 Tagen eine starke Reduktion der Tumorlast. Diese Tiere mussten jedoch aufgrund der starken Nebenwirkungen aus dem Versuch genommen werden. Die Behandlung mit 1,5 mg/kg Doxorubicin führte ebenfalls erst nach 30 Tagen zu einer merklichen Reduktion der Tumorlast. Die behandelten Tiere zeigten jedoch auch Symptome starker Nebenwirkungen. Als effektive Dosis wurde für den Hauptversuch deshalb 1 mg Doxorubicin pro kg Körpergewicht gewählt. Diese Dosis führte nur zu geringen Nebenwirkungen und zu einer minimalen Reduktion des Tumorwachstums, verglichen mit unbehandelten Tieren. Im folgenden Hauptversuch wurde nun der additive Effekt von 6A10 und Doxorubicin auf chemoresistente Brustkrebszellen analysiert. Hierzu wurden  $2 \cdot 10^6$  MDA-MB-231/mCherry/fLUC Zellen direkt in das linke inguinale Brustfettpolster von NSG-Mäusen injiziert und das Tumorwachstum wöchentlich durch biolumineszenzbasierte Bildgebung verfolgt. 14 Tage nach Zellinjektion wurde die Therapie begonnen. In diesem Versuch wurde zusätzlich ein Isotypkontrollantikörper verwendet, um die Spezifität eventueller Effekte des 6A10-Antikörpers zu belegen. Des Weiteren wurde das Fab-Fragment des 6A10-Antikörpers eingesetzt. Da Fab-Fragmente deutlich kleiner sind, können sie tiefer in Gewebe eindringen und eventuell stärkere Effekte hervorrufen. Es wurden 1 mg Doxo pro kg Körpergewicht sowie 100 µg 6A10 bzw. Isotypkontrollantikörper appliziert. Aufgrund der geringeren Masse wurden nur zwei Drittel der 6A10 Menge an Fab-6A10 eingesetzt (67 µg). Die Mäuse wurden à acht Tiere in folgende Gruppen eingeteilt:

A: Doxorubicin

B: Doxorubicin + 6A10

C: Doxorubicin + Isotypkontrollantikörper

D: 100 µg 6A10

E: Doxorubicin + Fab-6A10

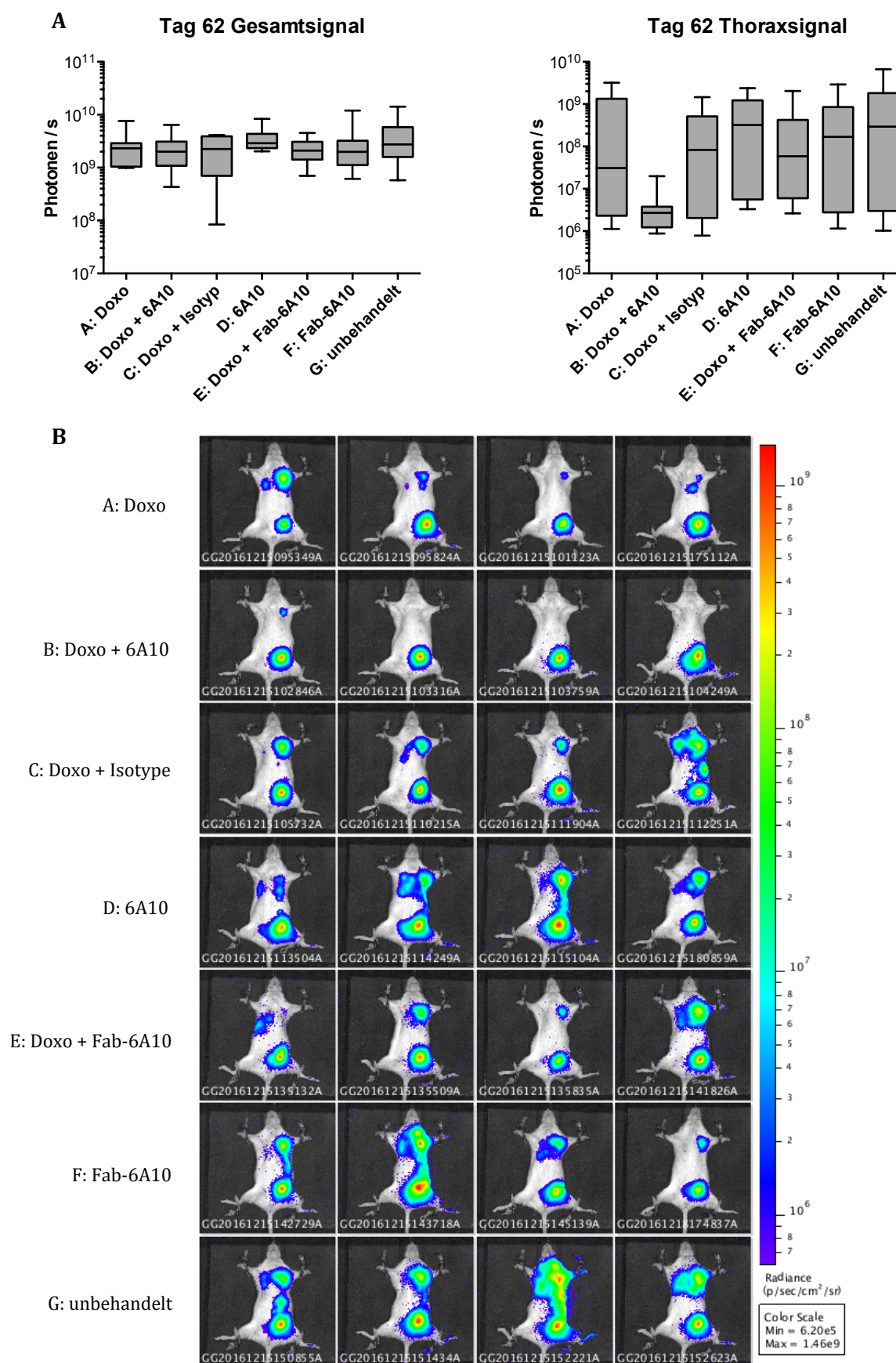
F: Fab-6A10

G: unbehandelt

Alle Therapeutika wurden zweimal wöchentlich intravenös (*i.v.*) appliziert und das Tumorwachstum weiterhin kontinuierlich durch wöchentliche Messungen der Biolumineszenz verfolgt. Der Versuch wurde nach 62 Tagen beendet, da Mäuse der Kontrollgruppe Symptome der Abbruchkriterien zeigten. Da metastasierende MDA-MB-231-Zellen einen starken Tropsimus in die Lunge aufweisen [137, 138] wurde bei der Auswertung der Biolumineszenzdaten sowohl das Gesamtsignal, als auch das Signal aus dem Thorax an Tag 62 gesondert betrachtet. Die Auswertung dieser Daten am Versuchsende ist in Abbildung 11 dargestellt. Zusätzlich wurde der Verlauf des Tumorwachstums im Bereich des Thorax über die gesamte Versuchsdauer analysiert (Abbildung 12).

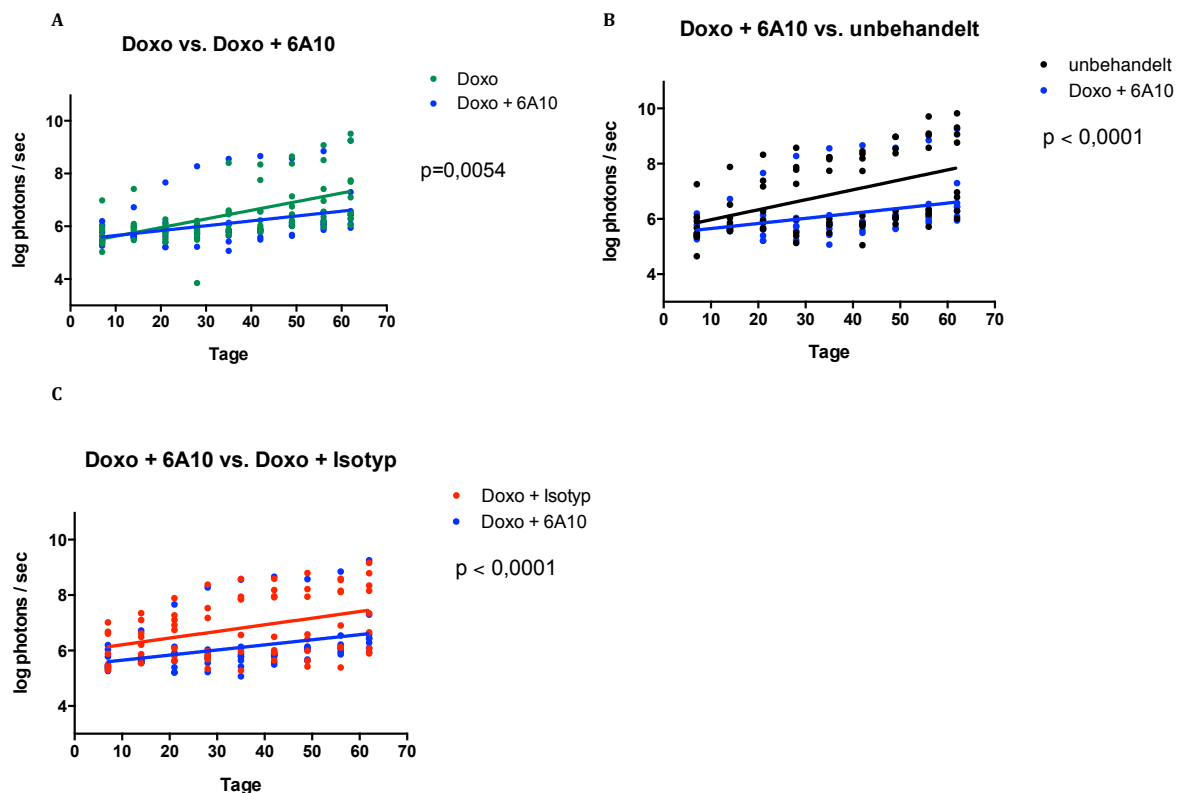
Die Ergebnisse dieses orthotopen Brustkrebsmodells zeigten deutlich, dass die verwendete Zelllinie nahezu resistent gegenüber der verwendeten Konzentration an Doxorubicin war. Keine der angewandten Therapieformen hatte signifikanten Einfluss auf die Gesamttumorlast (Abbildung 11 A). Wird jedoch nur das Tumorsignal aus dem Thoraxbereich gesondert betrachtet, so ist auffällig, dass die Tiere der Gruppe B (Doxorubicin + 6A10) ein deutlich geringeres Signal aufweisen. Bei Tieren der Gruppe A (Doxorubicin) ist dieser Effekt jedoch nicht erkennbar. Der Antikörper 6A10 alleine (Gruppe D) scheint ebenfalls keinen Einfluss auf die Metastasierung zu haben. Interessanterweise hatte auch die Kombinationstherapie aus Doxorubicin und Fab-6A10 (Gruppe E) keinen Einfluss auf die Metastasierung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung von Doxorubicin und 6A10 zwar nicht die Gesamttumorlast reduzierte, jedoch deutlich die Metastasierung chemoresistenter Tumorzellen in den Thorax und die Lunge beeinflusste.





**Abbildung 11:** Biolumineszenzdaten des orthotopen Brustkrebsmodells an Tag 62. **A:** Gesamtsignal und Thoraxsignal angegeben in Photonen/s. Daten sind in Boxplots inklusive Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. **B:** Repräsentative Bilder der Biolumineszenzmessungen an Tag 62 von exemplarischen Mäusen jeder Gruppe. Doxo = Doxorubicin.

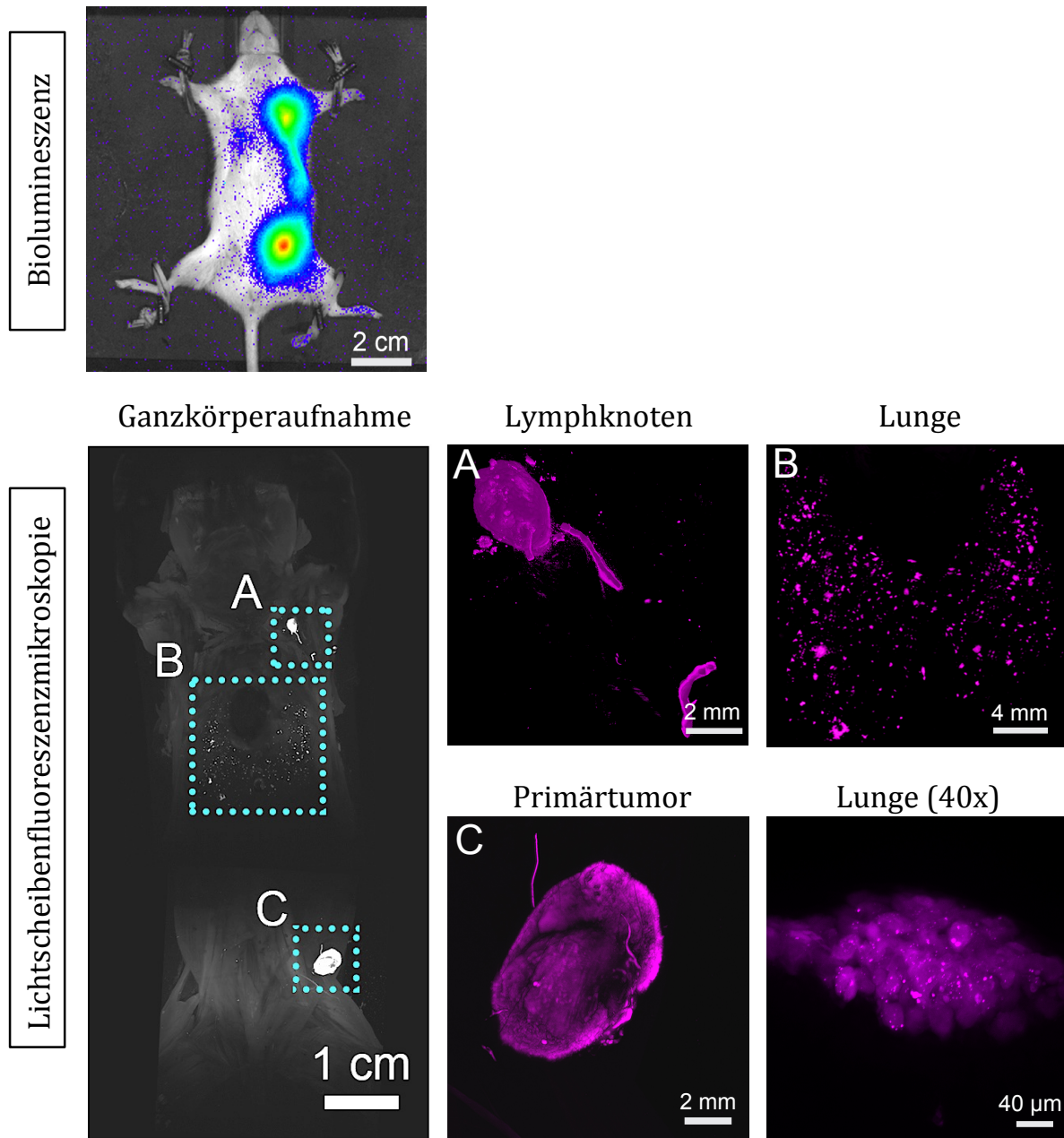
Dieser Unterschied wird auch bei Betrachtung der Biolumineszenzdaten im Thoraxbereich über den gesamten Zeitverlauf deutlich (Abbildung 12). Dabei zeigte sich, dass die Behandlung der Tiere mit Doxorubicin und 6A10, verglichen mit Tieren der Doxorubicin Einzeltherapie (A) oder mit unbehandelten Tieren (B), zu einer stark signifikanten Reduktion der Tumorsignale führte. Dieser Effekt ist spezifisch für den 6A10-Antikörper, da er durch Applikation des Isotypkontrollantikörpers nicht erreicht werden konnte (Abbildung 12 C).



**Abbildung 12:** Biolumineszenzdaten der Lungen über den gesamten Versuchsverlauf inklusive statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen. **A:** Doxorubicin behandelte Tiere verglichen mit Doxorubicin + 6A10 behandelten Tieren. **B:** Doxorubicin + 6A10 behandelte Tiere verglichen mit unbehandelten Tieren. **D:** Doxorubicin + 6A10 behandelte Tieren verglichen mit Doxo + Isotypantikörper behandelten Tieren.

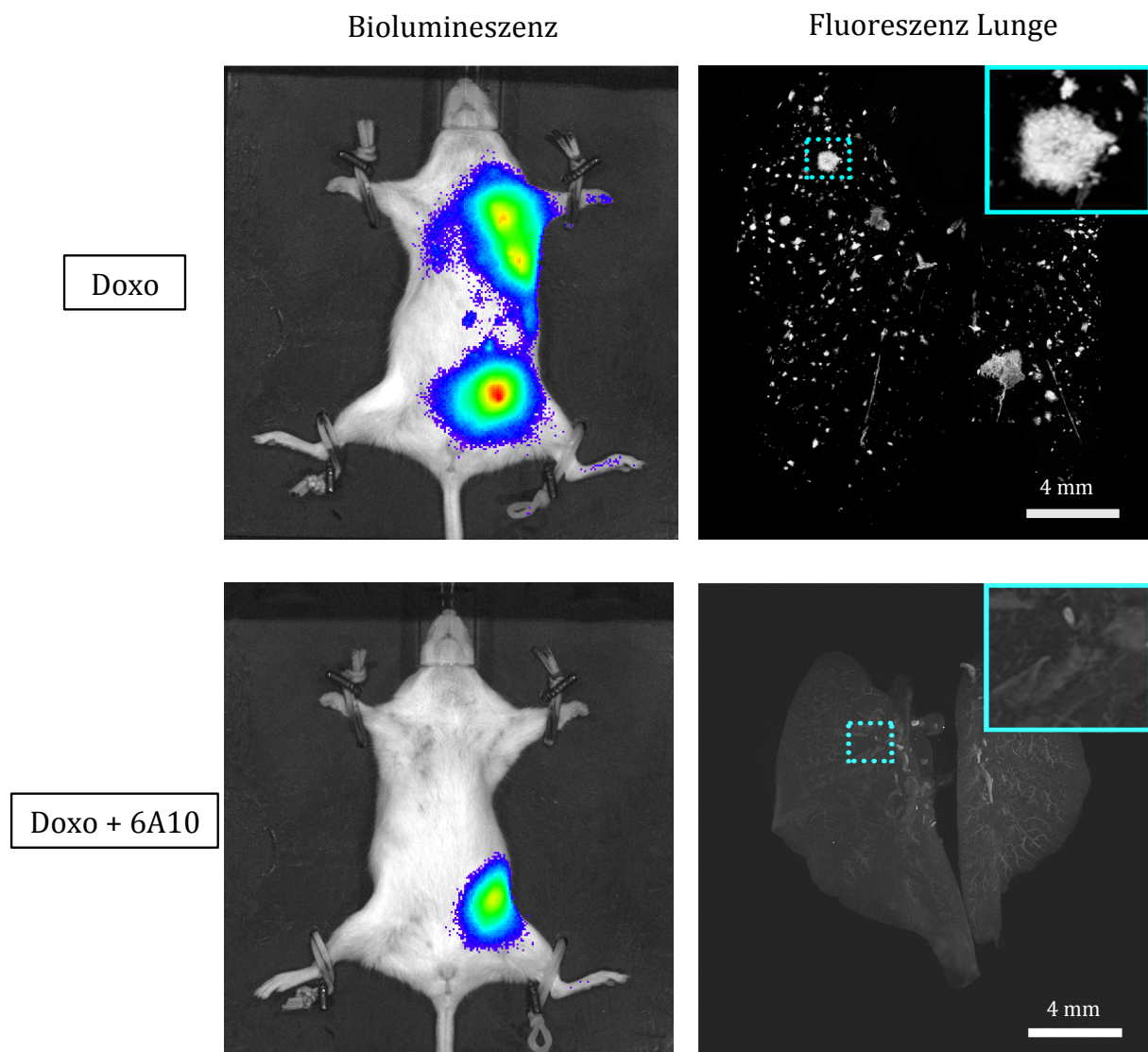
Um die Metastasierung in die Lunge genauer zu analysieren, wurden bei Versuchsabbruch alle Tiere transkardial perfundiert und an die Arbeitsgruppe von Dr. Ertürk (Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung, LMU) für hochauflösende dreidimensionale Ganzkörpermikroskopie mittels 3DISCO übergeben [130-133].

Die Analyse der Tumorzellen anhand einer Ganzkörperaufnahme zeigte, dass Tumorzellen zuerst in die axillaren Lymphknoten und dann weiter in die Lunge invadierten und dort Mikro- und Makrometastasen bildeten (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Detaillierte Analyse migrierter Tumorzellen in den Thorax und in die Lunge anhand dreidimensionaler Ganzkörpermikroskopie einer Maus der Fab-6A10 behandelten Gruppe. Biolumineszenzaufnahme bei Versuchsende an Tag 62 und Fluoreszenzaufnahmen der Tumorzellen (magenta) der ganzen Maus. Zusätzlich sind detailliertere Aufnahmen der Lymphknoten (A), der Lunge (B), des Primärtumors (C) sowie hochauflösende Aufnahme von Tumorzellen (magenta) in der Lunge in 40x Vergrößerung dargestellt. Bilder der AG Ertürk, Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung, LMU.

In Abbildung 14 sind repräsentative Bilder der detaillierten mikroskopischen Analyse der Lungen dargestellt. Verglichen mit der Doxorubicin-Einzeltherapie zeigten Tiere, die mit der Kombinationstherapie aus Doxorubicin und 6A10 behandelt worden waren, eine deutliche Reduktion an Lungenmetastasen. Dadurch wurden die Ergebnisse der Quantifizierung der Tumorsignale über Biolumineszenzmessung des Thorax verifiziert. Zusätzlich ist in dieser Abbildung erkennbar, dass MDA-MB-231 unterschiedlich große Makro- und Mikrometastasen in der Lunge bildeten.



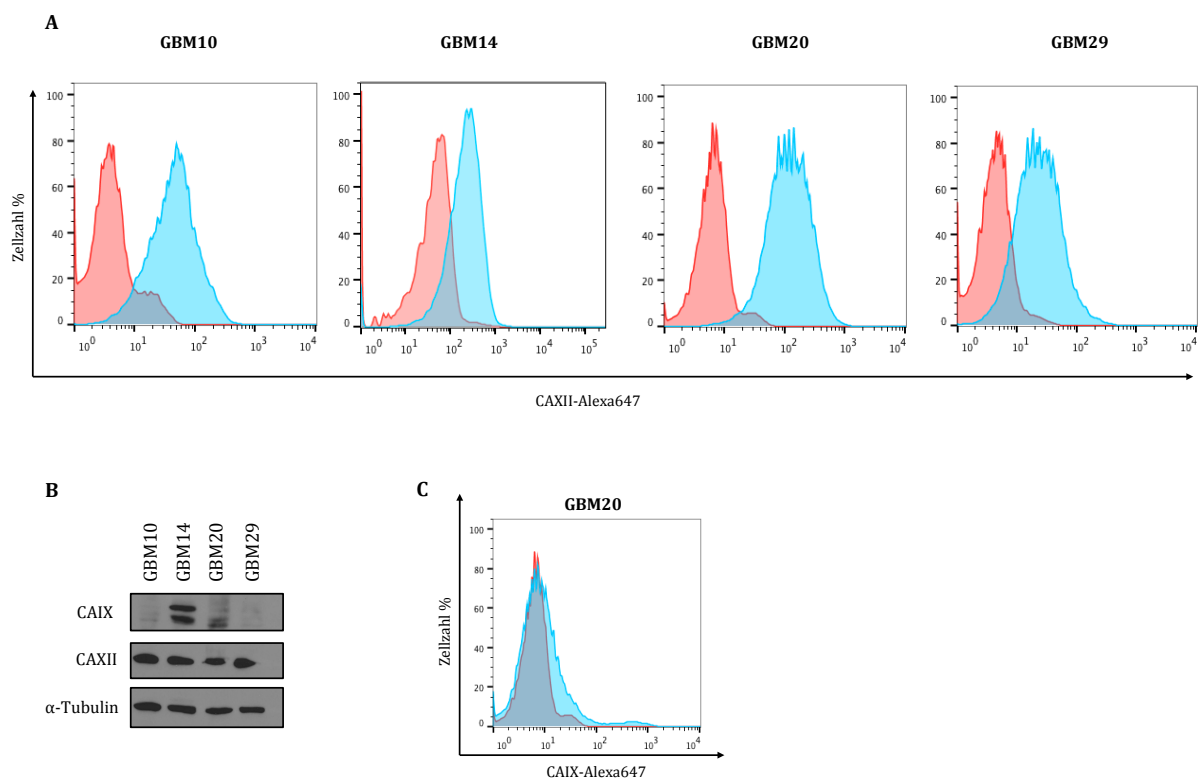
**Abbildung 14:** Repräsentative Bilder der Tumorzellen in der Lunge einer Doxorubicin (Doxo) behandelten Maus und einer Maus, die mit der Kombinationstherapie Doxorubicin + 6A10 behandelt worden waren. Es sind sowohl Aufnahmen der Biolumineszenzmessung, als auch Bilder der Fluoreszenzmessung der Lungen durch Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Kasten markieren die Vergrößerung von Makrometastasen in der Lunge. *Daten der AG Ertürk, Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung, LMU*



## 6.4 Effekt von 6A10 auf Glioblastoma multiforme *in vivo*

Da eine antitumorale Wirkung von 6A10 in verschiedenen *in vivo* Modellen bestätigt werden konnte [58], wurde in diesem Teil der Effekt von 6A10 in einem orthotopen Glioblastommodell untersucht. Verschiedene Analysen zeigten, dass CAXII in gesundem Hirngewebe nicht exprimiert wird, die Expression in Glioblastomen (GBM) jedoch stark hochreguliert ist [57, 139].

Um ein adäquates Modell zu entwickeln, wurde zunächst die CAXII-Expression auf verschiedenen GBM-Zelllinien durchflusszytometrisch bestimmt und per Western Blot bestätigt (Abbildung 15).



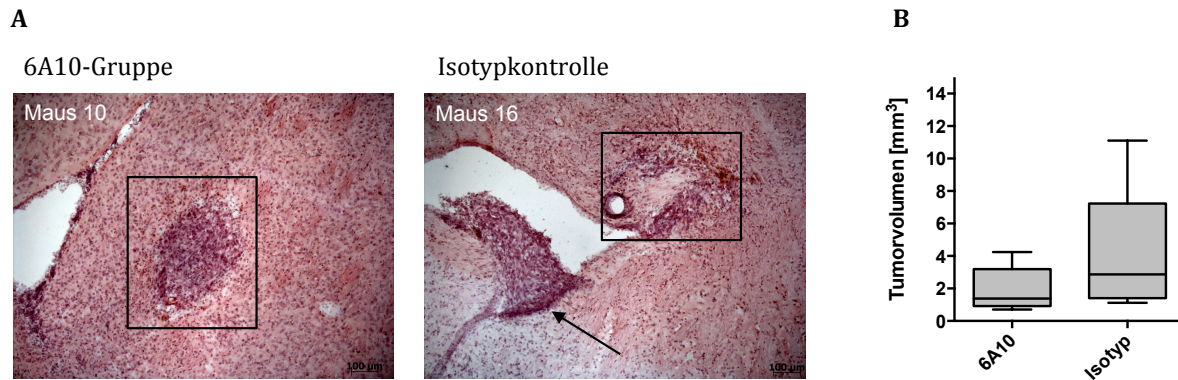
**Abbildung 15:** Expressionsanalyse von CAXII und CAIX auf verschiedenen GBM-Zelllinien. **A:** Durchflusszytometrische Analyse der CAXII-Expression. Rot: Isotypkontrolle, blau: CAXII-Färbung mit 6A10. **B:** Western Blot Analyse der CAXII und CAIX Expression. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. **C:** Durchflusszytometrische Analyse der CAIX-Expression auf GBM20 Zellen. Rot: Isotypkontrolle, blau: CAIX-Färbung mit 10E12.

Die Zelllinie GBM20 wurde im Folgenden für das orthotope GBM-Modell verwendet, da sie die höchste CAXII-Expression, jedoch nur eine geringe CAIX-Expression aufwies. Dadurch konnte spezifisch nur der Effekt von 6A10 auf CAXII untersucht werden und eventuelle Kompensationseffekt von CAIX weitestgehend reduziert werden.

Für das orthotope GBM-Modell wurden athymische Nacktmäuse (Athymic Nude Foxn1<sup>nu</sup>) verwendet. Sieben Tiere wurden mit 6A10, sieben weitere Tiere mit einem Isotypkontrollantikörper behandelt. Das Modell wurde in Kooperation mit Prof. Glaß und der Arbeitsgruppe Neurochirurgische Forschung am Klinikum der Universität München durchgeführt.

GBM20-Zellen wurden mit 6A10-Antikörper oder Isotypkontrollantikörper mit einer Konzentration von je 1 µg/ml für 20 min vorinkubiert, um Bindestellen vorab abzusättigen. Die Zellen wurden gewaschen und in DMEM/F12 Medium ohne Zusätze aufgenommen. Je Tier wurden  $1 \cdot 10^5$  GBM20-Zellen intracerebral injiziert. Drei Tage nach Tumorinokulation folgte die Implantation von osmotischen Mikropumpen nach Herstellerangaben direkt an die Tumorinokulationsstelle. Mithilfe dieser Pumpen erfolgte eine kontinuierliche Abgabe von 6A10- und Kontrollantikörper über 14 Tage mit einer Flussrate von ca. 0,25 µl pro Stunde. Dadurch wurden insgesamt 150 µg Antikörper appliziert. 14 Tage nach Implantation der Pumpen wurden alle Tiere transkardial perfundiert, die entnommenen Gehirne für zwei Tage in 4 % PFA fixiert und danach für zwei weitere Tage in 30 % Saccharose entwässert. Anschließend folgte das Anfertigen von Kryoschnitten.

Um das Tumolvolumen zu bestimmen, wurde eine H&E-Färbung der Schnitte angefertigt. Anhand dieser Färbungen wurde die Tumorfläche jeder Schnittebene mikroskopisch vermessen und daraus das Tumolvolumen berechnet. Die Ergebnisse der Tumolvolumenbestimmung, als auch beispielhafte Bilder der H&E-Färbungen sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** Auswertung des orthotopen GBM-Models. **A:** Repräsentative Bilder der H&E-Färbungen. Die schwarzen Rechtecke markieren den Haupttumor, der schwarze Pfeil markiert in Ventrikel invadierte Tumorzellen. **B:** Tumorzellen in Kubikmillimeter. Die Daten sind in Boxplots inklusive Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt.

Die Bestimmung der Tumorzellen zeigte, dass Mäuse, die mit 6A10 behandelt worden waren ein verringertes Tumorzellen aufwiesen. Tiere der Kontrollgruppe hatten ein durchschnittliches Tumorzellen von 4,23 mm<sup>3</sup>, wohingegen die 6A10-behandelte Gruppe in reduziertes Tumorzellen von nur 1,92 mm<sup>3</sup> aufwies.

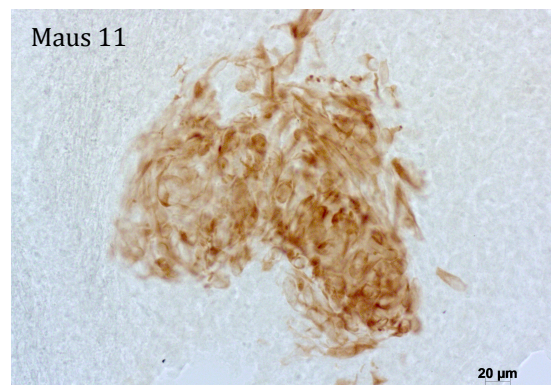
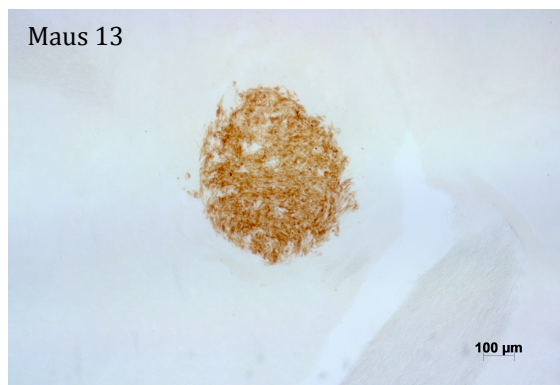
Um einzelne Tumorzellen besser visualisieren zu können, wurden Kryoschnitte mit einem humanspezifischen anti-Vimentin Antikörper gefärbt. Anhand dieser Färbung wurde erneut das Tumorzellen berechnet und zusätzlich die Zahl an invadierten Zellen ausgezählt. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 17 zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass auch anhand der Vimentin-Färbung die 6A10 behandelte Gruppe ein verringertes mittleres Tumorzellen aufwies. Daher konnten vorherige Ergebnisse der Tumorzellenbestimmung anhand der H&E-Färbung verifiziert werden. Des Weiteren konnte bei 6A10-behandelten Tieren eine signifikant geringere Anzahl invasiv wachsender Zellen detektiert werden (Abbildung 17 C).

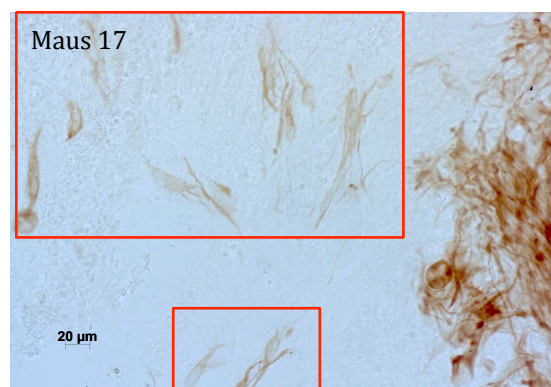
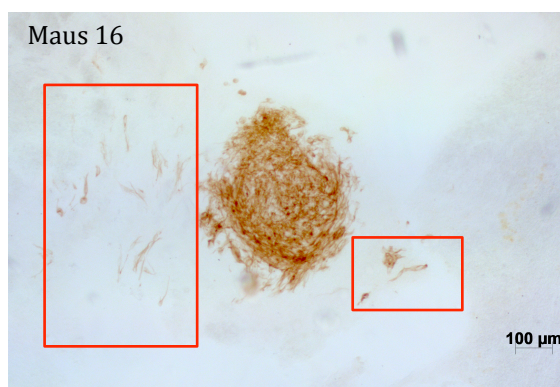
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Behandlung mit 6A10 zu einem verringerten Tumorzellen und zu einer verminderten Invasion der Tumorzellen führt.

**A**

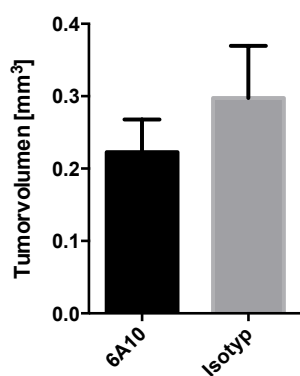
6A10-Gruppe



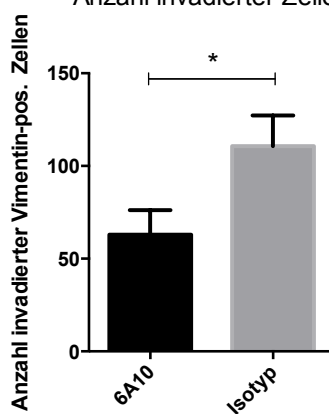
Isotypkontrolle

**B**

Vimentin Färbung

**C**

Anzahl invadierter Zellen



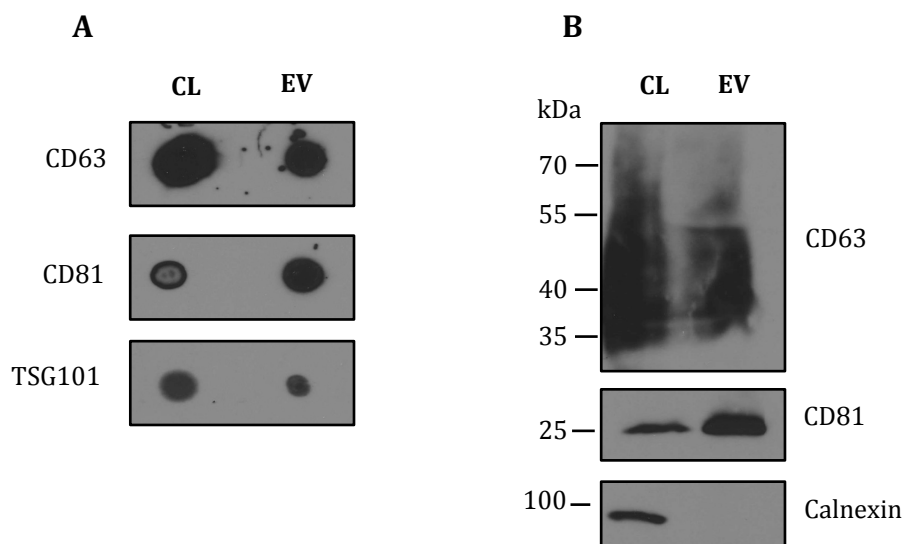
**Abbildung 17:** Analyse der humanspezifischen  $\alpha$ -Vimentin gefärbten Kryoschnitte. **A:** Repräsentative Bilder der anti-Vimentin-Färbung der 6A10-behandelten Gruppe sowie der Kontrollgruppe. Die roten Kästen markieren invasiv wachsende Tumorzellen. **B:** Tumervolumen berechnet anhand der anti-Vimentin Färbung. **C:** Anzahl invadierter Vimentin-positiver Zellen. Es sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichung dargestellt. Sterne markieren die jeweilige statistische Signifikanz. Daten von Song Gu, Arbeitsgruppe Neurochirurgische Forschung der LMU.



## 7 Ergebnisse CD73 und 22E6

### 7.1 Isolierung von GBM20 EV für die Immunisierung

Der Antikörper 22E6 entstand aus einer Immunisierung einer Ratte mit EV, welche aus Zellkulturüberstand von GBM20-Zellen isoliert worden waren. Hierfür wurden EV nach 5.2.8 isoliert und mittels Dot Blot auf verschiedene Vesikelmarker getestet. Die Ergebnisse wurden durch Western Blot Analysen verifiziert. Als Kontrolle diente jeweils GBM20-Zelllysate. Als Negativkontrolle wurde im Western Blot die Expression von Calnexin analysiert. Da es sich hierbei um ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums handelt, sollte es nur im Zelllysate und nicht in EV nachweisbar sein [140] (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Charakterisierung von GBM20-EV für die Immunisierung. **A:** Dot Blot Analyse auf Vesikelmarker CD63, CD81 und TSG101. **B:** Western Blot-Analyse der isolierten GBM20-EV für die Marker CD63 und CD81. Calnexin diente als Negativkontrolle. CL = Zelllysate.

Die Blotanalysen zeigten, dass erfolgreich EV aus GBM20 Kulturüberstand isoliert worden waren. Die Präparationen zeigten sowohl im Dot Blot, als auch im Western Blot positive Signale für die Vesikelmarker CD63, CD81, TSG101 und CD81. Die Western Blot-Analyse zeigte zusätzlich, dass kein Calnexin in der EV Präparation nachweisbar war. Diese EV wurden für die Immunisierung verwendet.

## **7.2 Charakterisierung primärer Hybridomüberstände und Analyse der Antikörperspezifität**

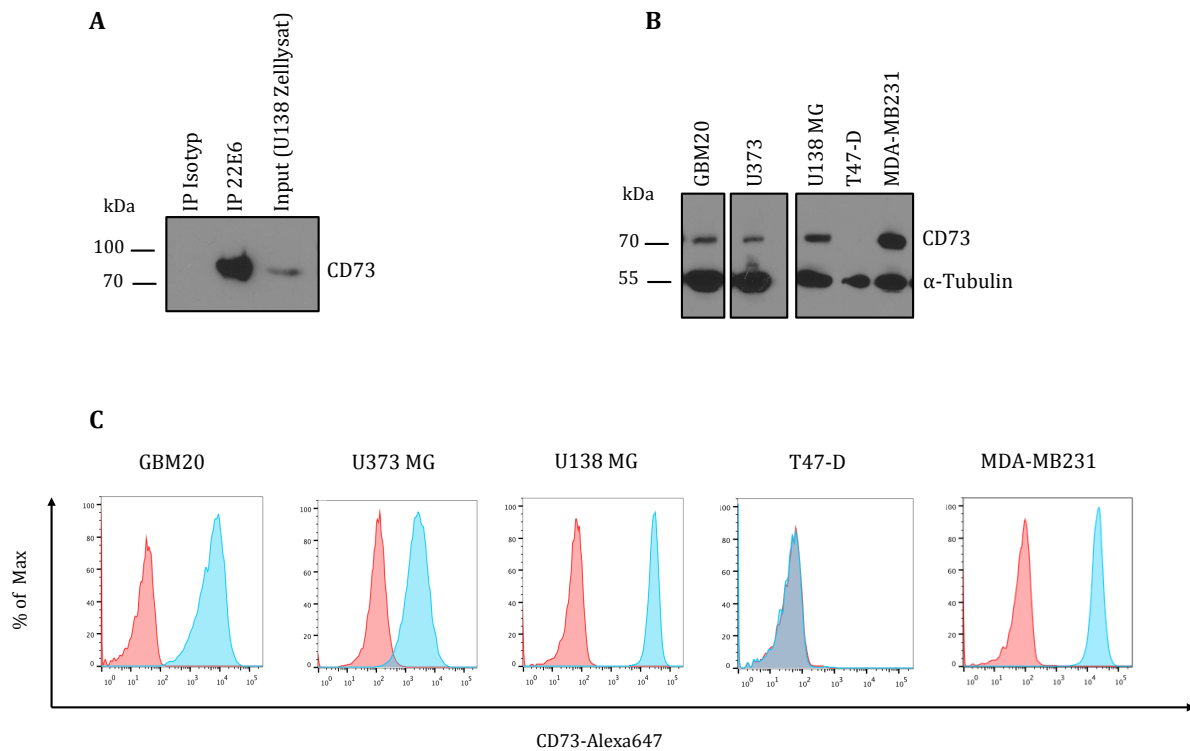
Die Immunisierung erfolgte wie in 5.4.1 beschrieben. Die erhaltenen primären Hybridomüberstände wurden zunächst per Durchflusszytometrie auf Bindung an GBM20-Zellen getestet. Um die Spezifität positiver, stabiler Klone zu identifizieren, wurden Immunpräzipitationen (IP) nach 5.1.4 durchgeführt und massenspektrometrisch an der „Core facility Proteomics“ des Helmholtz-Zentrums München analysiert.

### **7.2.1 Der Antikörper 22E6 bindet humanes CD73**

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der IP ergaben, dass 22E6 humanes CD73 bindet. Um dies zu bestätigen, wurde erneut eine IP mit 22E6 und Lysaten aus stark CD73-positiven U138MG-Zellen durchgeführt. Das Eluat der IP wurde per Western Blot und einem kommerziell erhältlichen anti-CD73-Antikörper auf CD73 getestet. Als Kontrolle wurde in der IP ein Isotypkontrollantikörper verwendet (Abbildung 19 A).

Zusätzlich wurde die Expression von CD73 auf verschiedenen Tumorzelllinien per Western Blot mit einem kommerziell erhältlichen anti-CD73 Antikörper getestet und per Durchflusszytometrie mit 22E6 bestätigt. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

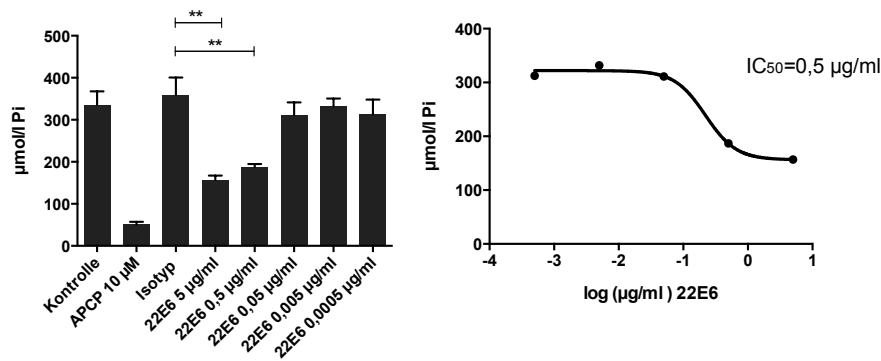
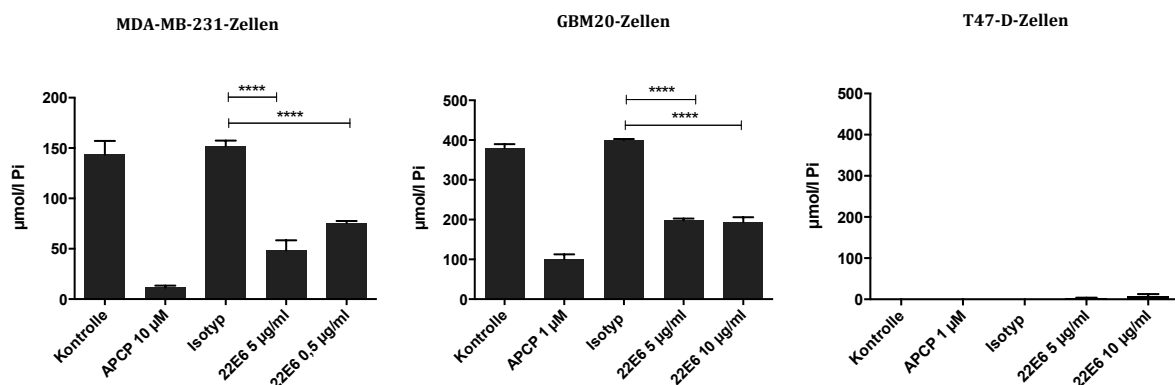
Die Spezifität von 22E6 konnte durch diese Experimente bestätigt werden. Die IP mit 22E6 zeigte ein spezifisches Signal für CD73, jedoch kein Signal bei Verwendung des Isotypkontrollantikörpers. Die Expressionsanalysen von CD73 auf verschiedenen Tumorzelllinien mittels Western Blot wurde durch die durchflusszytometrische Analyse mit 22E6 verifiziert. Die Mammakarzinom-Zelllinie T47-D exprimierte kein CD73 und wurde daher in weiteren Versuchen als Negativkontrolle verwendet.



**Abbildung 19:** Analyse der 22E6 Spezifität. **A:** IP mit 22E6 und Isotypkontrolle, Western Blot mit einem kommerziell erhältlichen anti-CD73 Antikörper. Als Input wurden 20  $\mu$ g U138MG-Zelllysate aufgetragen. **B:** CD73-Expressionsanalyse verschiedener Tumorzelllinien per Western Blot und eines kommerziell erhältlichen anti-CD73 Antikörpers.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. **C:** Durchflusszytometrische Analyse der CD73-Expression verschiedener Zelllinien mit Hilfe des 22E6 Antikörpers. Rot: Isotypkontrolle, blau: 22E6.

### 7.3 Untersuchung des Effekts von 22E6 auf die CD73-Enzymaktivität

Nachdem die Bindung von 22E6 an CD73 bestätigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt getestet, ob 22E6 Einfluss auf die CD73-Aktivität von Tumorzellen hat. Die CD73-Aktivität wurde nach 5.2.13 und 5.2.13.1 bestimmt. Als Inhibitionskontrolle wurde der chemische CD73-Inhibitor APCP mit einer Konzentration zwischen 1-10  $\mu$ M eingesetzt. Zellen ohne Inhibitor dienten als Positivkontrolle und gaben Aussagen über das Basislevel der CD73-Aktivität der entsprechenden Zellen. Zusätzlich wurde ein Isotypkontrollantikörper mit 10  $\mu$ g/ml eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 zusammengefasst.

**A Titration von 22E6 auf U138MG-Zellen****B**

**Abbildung 20:** CD73-Aktivität auf verschiedenen Zelllinien angegeben in µmol/l freien Phosphats (Pi). **A:** Titration von 22E6 auf U138MG-Zellen und daraus bestimmte IC<sub>50</sub>. **B:** Inhibierung der CD73-Aktivität auf MDA-MB-231-Zellen, GBM20-Zellen sowie T47-D-Zellen (Negativkontrolle). Es sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichung aus biologischen Triplikaten dargestellt. Sterne markieren die jeweilige statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen deutlich, dass 22E6 die Aktivität von CD73 auf Tumorzellen inhibiert. Da durch die Zugabe von 22E6 weniger AMP hydrolysiert wurde, konnte auch weniger Phosphat im Reaktionsansatz detektiert werden. Durch den chemischen Inhibitor APCP wurde die Enzymaktivität ebenfalls verringert.

Die Titration von 22E6 auf U138MG Zellen resultierte in einer IC<sub>50</sub> von 0,5 µg/ml. In weiteren Versuchen wurde 22E6 zwischen 5 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt (Abbildung 20 A). Die Inhibierung der CD73-Aktivität konnte auf verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Die Spezifität des Inhibitionsassays wurde durch die Analyse von T47-D Zellen bestätigt (Abbildung 20 B).

Hier konnte kein anorganisches Phosphat detektiert werden, da aufgrund der fehlenden CD73-Expression kein AMP hydrolysiert wurde (Abbildung 19 B und C). Auffällig war, dass mit 22E6 immer eine enzymatische Restaktivität nachweisbar war, die sich auch mit höheren Antikörperkonzentrationen von 10 µg/ml nicht weiter reduzieren ließ.

Um die Spezifität und inhibitorischen Eigenschaften von 22E6 weiter zu verifizieren, wurden CD73-negative 293T-Zellen stabil mit einem CD73-Expressionsplasmid transfiziert. Die Expression von CD73 auf 293T/CD73-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie durch eine Färbung mit 22E6 analysiert. Zusätzlich wurden diese Ergebnisse durch Western Blot mit einem kommerziell erhältlichen anti-CD73 Antikörper bestätigt. Die CD73-Aktivität wurde sowohl auf nativen 293T, als auch auf 293T/CD73-Zellen unter Einfluss von 22E6 und APCP nach 5.2.13 getestet (Abbildung 21).

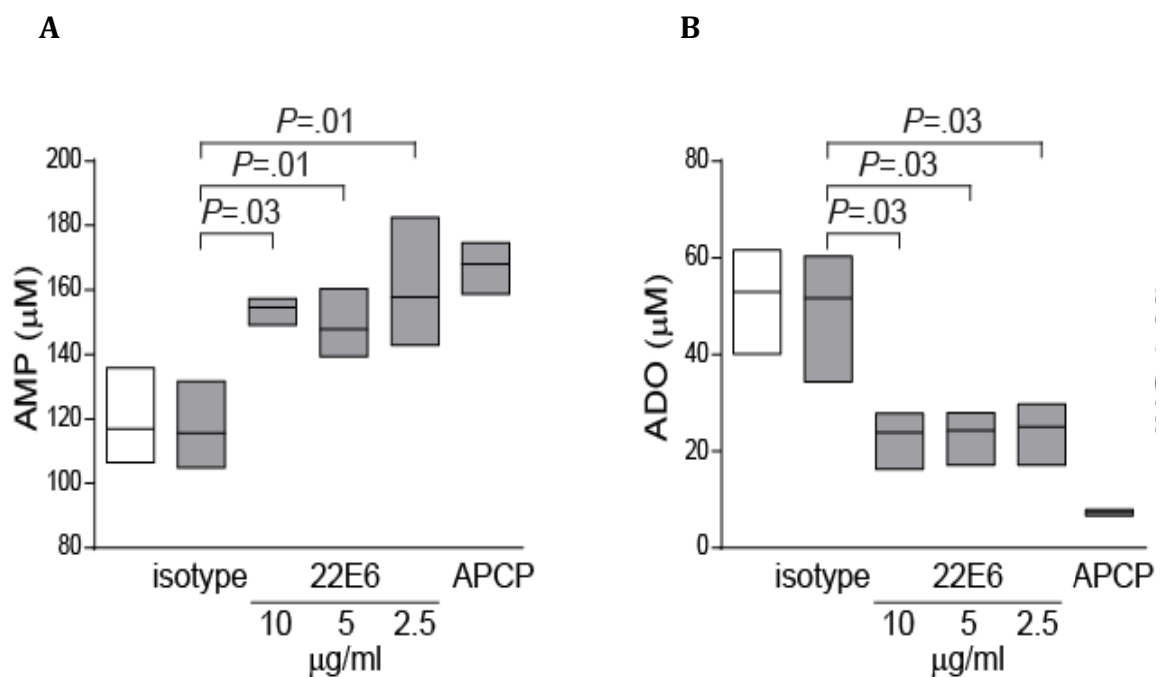


**Abbildung 21:** Analyse der Inhibition von CD73 durch 22E6 auf 293T/CD73 Zellen. **A:** Durchflusszytometrische Analyse der CD73-Expression stabil transfizierter und sortierter 293T/CD73-Zellen. Grün: 293T-Zellen, blau: 293T/CD73-Zellen. CD73 Färbung mit 22E6. **B:** Western Blot-Analyse der CD73-Expression mit einem kommerziellen anti-CD73 Antikörper.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. **C:** CD73-Aktivitätsassay auf 293T- und 293T/CD73-Zellen, die Daten sind angegeben in µmol/l freien Phosphats (Pi). Es sind die Mittelwerte inklusive der Standardabweichung aus biologischen Triplikaten dargestellt.

293T-Zellen wurden erfolgreich stabil mit CD73 transfiziert. Dies konnte sowohl über Durchflusszytometrie, als auch mittels Western Blot bestätigt werden (Abbildung 21 A und B). Die Aktivität von CD73 konnte auch auf diesen Zellen durch 22E6 reduziert werden, trotzdem war wieder eine gewisse Restaktivität von CD73 messbar (Abbildung 21 C). In diesem Fall war die Inhibition mit 22E6 genau so effektiv, wie die Inhibition mit APCP. Parentale 293T-Zellen exprimieren kein CD73, folglich konnte auch keine CD73-Aktivität nachgewiesen werden.

### 7.3.1 Analyse der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentration

In allen vorherigen Versuchen wurde die CD73-Aktivität über die freigesetzte Phosphatkonzentration bestimmt. In Kooperation mit Dr. Silvia Deaglio (Universität Turin) geschah dies nun über die Bestimmung der extrazellulären Konzentration von AMP und Adenosin mittels HPLC nach 5.2.13.2. Dadurch konnte die CD73-Aktivität direkt über die Abnahme des Substrats AMP und durch die gleichzeitige Zunahme des Produkts Adenosin analysiert werden. Für diese Versuche wurde die CD73-positive Melanomzelllinie A375 verwendet. A375-Zellen wurden mit APCP (10  $\mu$ M), 22E6 oder einem Isotypkontrollantikörper behandelt und mit 200  $\mu$ M AMP für eine Stunde inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Es folgte die Bestimmung der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentration mittels HPLC-Analyse. (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Bestimmung der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentration mittels HPLC im Überstand von A375-Zellen unter Blockierung von CD73 durch 22E6. Als Kontrolle diente ein Isotypkontrollantikörper (10  $\mu$ g/ml), als Inhibitionskontrolle wurden Zellen mit APCP (10  $\mu$ M) inkubiert. 22E6 wurde mit 10, 5 und 2,5  $\mu$ g/ml eingesetzt. Unbehandelte Zellen dienen als Positivkontrolle (weiße Box). **A:** Bestimmung der extrazellulären AMP- Konzentration. **B:** Analyse der extrazellulären Adenosinkonzentration (ADO). Daten sind in *Boxplots* inklusive statistischer Signifikanz dargestellt. Daten von Dr. Deaglio, Universität Turin.

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Inkubation der Zellen mit 22E6 die Funktion von CD73 inhibierte. Dies konnte durch die Analyse der extrazellulären Konzentration an AMP und Adenosin bestätigt werden. Die Zugabe von 22E6 vermindert den Abbau des Substrats AMP und führt somit zu einer reduzierten Bildung von extrazellulärem Adenosin (Abbildung 22).

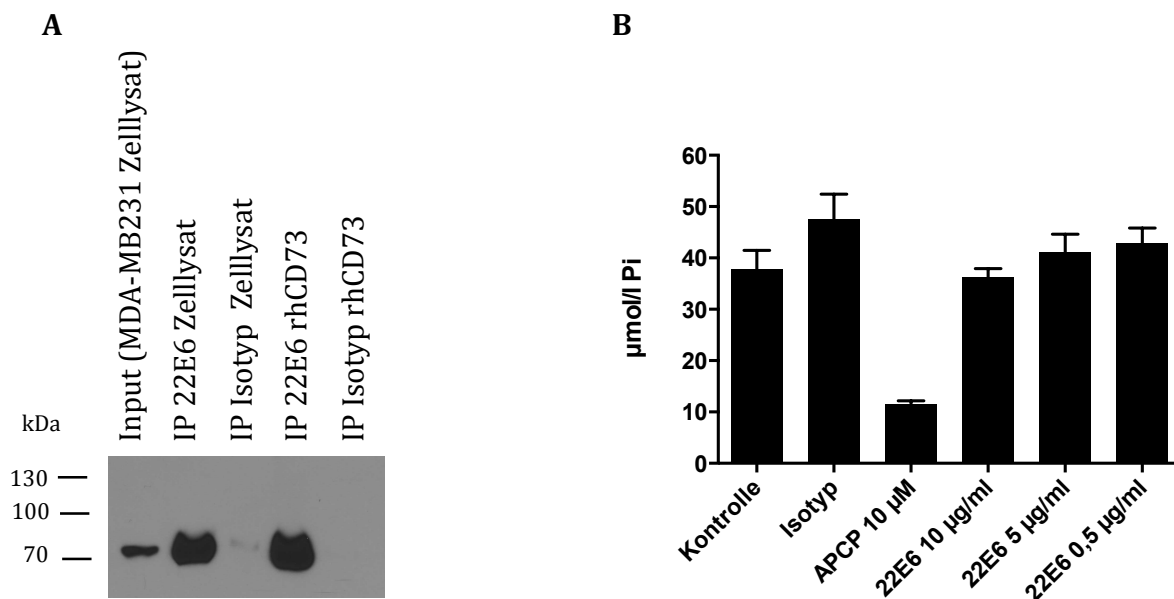
In diesen Versuchen zeigte sich erneut, dass eine Erhöhung der 22E6-Konzentration auf 10 µg/ml nicht zu einer verstärkten Inhibierung führt und trotzdem eine gewisse Restaktivität von CD73 messbar war. Insgesamt konnten durch diese Versuche die Ergebnisse der Bestimmung der CD73-Aktivität mittels Phosphatbestimmung verifiziert werden.

### **7.3.2 Effekt von 22E6 auf lösliches rekombinantes CD73**

Nachdem die Inhibierung von CD73 durch 22E6 auf verschiedenen Modellzelllinien gezeigt werden konnte, wurde nun der Effekt auf lösliches, rekombinantes, humanes CD73 (rhCD73) untersucht. Um zuvor die Bindung von 22E6 an lösliches rhCD73 zu testen, wurde eine IP nach 5.1.4 durchgeführt. Anstatt Zelllysate wurden hier 0,75 µg rhCD73 eingesetzt. Als Kontrolle der Spezifität von 22E6 wurde die IP parallel mit einem Isotypkontrollantikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine IP mit 22E6 und MDA-MB-231-Zelllysate. Die Eluate der IP wurde anschließend in einem Western Blot mit einem kommerziellen anti-CD73-Antikörper analysiert. Als Kontrolle wurden dabei 20 µg MDA-MB-231-Zelllysate aufgetragen.

Dabei zeigte sich, dass 22E6 nicht nur zelluläres CD73, sondern auch lösliches rhCD73 bindet (Abbildung 23 A). Sowohl die IP mit Zelllysate, als auch die IP mit rhCD73 lieferten im Western Blot eine prominente Bande der erwarteten Größe (70 kDa). Diese Bande wurde ebenfalls im MDA-MB-231 Zelllysate detektiert. Die Kontroll-IPs mit einem Isotypkontrollantikörper lieferten hingegen keine Bande. Dadurch konnte die spezifische Bindung von 22E6 sowohl an zelluläres, als auch an lösliches rhCD73 bestätigt werden.

Die Aktivitätsbestimmung von löslichem rhCD73 unter Einfluss von 22E6 und dem CD73-Inhibitor APCP erfolgte wie in 5.1.5 beschrieben. Es wurden 10 µg/ml (66 nM), 5 µg/ml (33 nM) und 0,5 µg/ml (3,3 nM) 22E6 eingesetzt. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse zusammengefasst.



**Abbildung 23:** Analyse des Effektes von 22E6 auf lösliches rhCD73. **A:** IP zur Analyse der Bindung von 22E6 an lösliches rhCD73. Als Kontrolle der 22E6 Spezifität wurde die IP zusätzlich mit einem Isotypkontrollantikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle diente jeweils die IP mit MDA-MB-231-Zelllysate. Die Ergebnisse wurden mittels Western Blot über einen kommerziellen anti-CD73 Antikörper detektiert. Zusätzlich wurden 20 µg MDA-MB-231-Zelllysate als Kontrolle des anti-CD73 Western Blots aufgetragen. **B:** Assay zur Aktivitätsbestimmung von löslichem rhCD73 unter Einfluss von 22E6 bzw. APCP angegeben in µmol/l freien Phosphats (Pi). Es sind die Mittelwerte inklusive der Standardabweichung aus biologischen Triplikaten dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 23 zeigen, dass 22E6 rhCD73 spezifisch bindet. Allerdings scheint 22E6 keinen inhibitorischen Effekt auf lösliches rhCD73 zu haben. Der chemische CD73 Inhibitor APCP hingegen reduzierte die Aktivität von löslichem rhCD73. 22E6 konnte auch in höheren Konzentrationen von 10 µg/ml (66 nM) die enzymatische Aktivität nicht verringern.



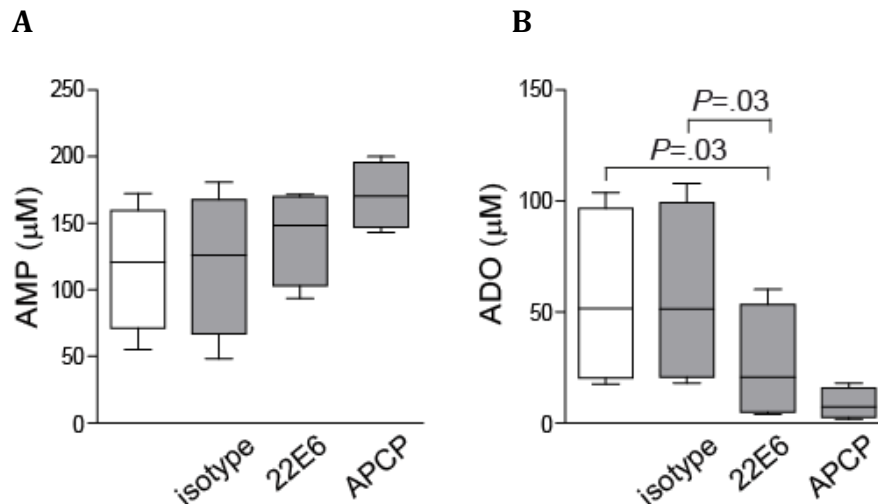
## **7.4 Inhibierung von CD73 auf Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) durch 22E6**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Inhibierung von zellulärem CD73 durch 22E6 gezeigt werden. Folgende Experimente dienten dazu, Effekte der reduzierten CD73-Aktivität auf Zellen aufzuzeigen. CD73 ist nicht nur auf verschiedenen soliden Tumorarten [141], sondern auch auf Zellen bestimmter Leukämiearten überexprimiert [142]. Es ist beschrieben, dass erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentrationen die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose von CLL-Zellen unterdrücken [86]. Eine gesteigerte CD73-Aktivität scheint also auch bei chemoresistenten Phänotypen bestimmter Tumorzellen eine Rolle zu spielen.

In Kooperation mit Dr. Deaglio von der Universität Turin wurde in diesem Zusammenhang der Effekt einer Blockierung von CD73 auf CLL-Zellen durch 22E6 bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Etoposid untersucht. Die folgenden Experimente wurden von Dr. Deaglio in Turin durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde die Inhibierung von CD73 durch 22E6 auf CD73-positiven primären CLL-Zellen analysiert. Um dies zu testen wurden die Zellen mit 2,5 µg/ml 22E6, einem Isotypkontrollantikörper (2,5 µg/ml) oder mit dem chemischen CD73 Inhibitor APCP (10 µM) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach Zugabe von 200 µM AMP wurden die Zellen für eine Stunde inkubiert. Die CD73 Aktivität wurde durch die anschließende Analyse der extrazellulären AMP- und Adenosinkonzentrationen nach 5.2.13.2 bestimmt.

Die Kultivierung von CLL-Zellen mit 22E6 führte zu einer signifikanten reduzierten enzymatischen Umwandlung von AMP zu Adenosin (Abbildung 24). Die Inkubation mit einem Isotypkontrollantikörper hatte keinen Einfluss auf die AMP-Hydrolyse. Die Blockierung von CD73 durch APCP führte ebenfalls zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität.



**Abbildung 24:** Blockierung der CD73-Aktivität auf primären CLL-Zellen. CD73-positive B-Zellen wurden aus CLL-Patienten isoliert und mit 22E6 (2,5 µg/ml), einem Isotypkontrollantikörper (2,5 µg/ml) oder 10 µM APCP inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (weiße Box). Nach Inkubation für eine Stunde unter Zugabe von 200 µM AMP wurde die extrazelluläre Konzentration an AMP (**A**) und Adenosin (ADO, **B**) durch HPLC-Analyse bestimmt. Daten sind in *Boxplots* inklusive Standardabweichung und statistischer Signifikanz dargestellt. Es handelt sich um kumulative Daten aus vier unabhängigen Experimenten. *Daten von Dr. Deaglio, Universität Turin.*

Nachdem erfolgreich die Blockierung von CD73 auf primären CLL-Zellen durch 22E6 gezeigt werden konnte, wurde nun der Effekt auf die Resistenz der Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Etoposid untersucht.

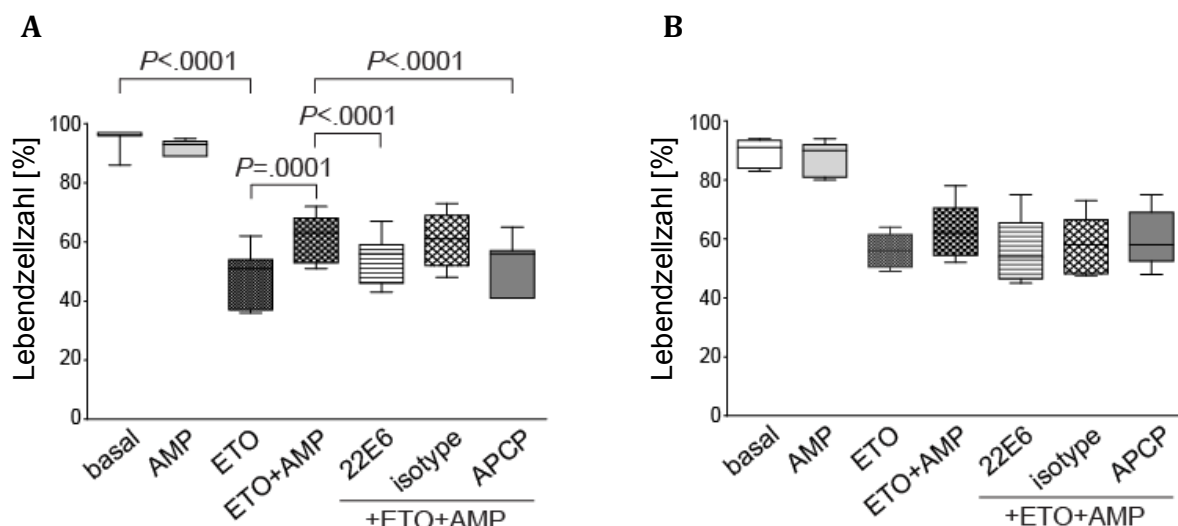
Für erste Analysen wurde die CLL-Modellzelllinie OSU-CLL verwendet [143]. Die Zellen wurde in AIM V® Medium ohne Serum unter Zugabe von 50 µM Etoposid für 16 Stunden kultiviert. Um den zytoprotektiven Effekt von Adenosin zu analysieren, wurden die Zellen zusätzlich mit 200 µM AMP inkubiert, welches durch CD73 in Adenosin hydrolysiert wurde. Danach folgte die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen durch die Färbung mit Propidiumiodid und Annexin V.

Um den Effekt der CD73-Inhibierung zu untersuchen, wurden Zellen vor Etoposid- und AMP-Zugabe für 30 min mit 22E6 (2,5 µg/ml), einem Isotypkontrollantikörper (2,5 µg/ml) oder APCP (10 µM) inkubiert. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Etoposid bei OSU-CLL-Zellen Apoptose induzierte. Der Anteil lebender Zellen sank auf ca. 50 % ( $49 \pm 9,3$  %). Durch die Zugabe von AMP, was durch CD73 zu Adenosin umgewandelt wird, sank die Anzahl an lebender Zellen auf nur  $62 \pm 7,8$  %. Adenosin schien einen zytoprotektiven Effekt zu vermitteln.

Diese Wirkung des Adenosins konnte durch das Blockieren von CD73 durch 22E6 aufgehoben werden. Die Inkubation der Zellen mit 22E6 führte dazu, dass der Anteil lebender Zellen bei  $55 \pm 8,1$  % lag. Der CD73-Inhibitor APCP reduzierte ebenfalls diesen zytoprotektiven Effekt ( $53 \pm 8,1$  % Lebendzellzahl). Die Inkubation mit einem Isotypkontrollantikörper führte nicht zu einem erhöhten Anteil lebender Zellen ( $61 \pm 9$  % Lebendzellzahl) (Abbildung 25 A).

Dieser Zusammenhang wurde im Anschluss auch auf CD73-positiven CLL-Zellen von fünf verschiedenen Patienten untersucht, die auf die Behandlung mit Etoposid mit einer reduzierten Zellviabilität reagierten (Abbildung 25 B). Durch die Zugabe von AMP stieg die Zellviabilität trotz Etoposid deutlich an. Die Blockierung von CD73 mit 22E6 oder APCP, konnten diesen Effekt jedoch wieder verringern.

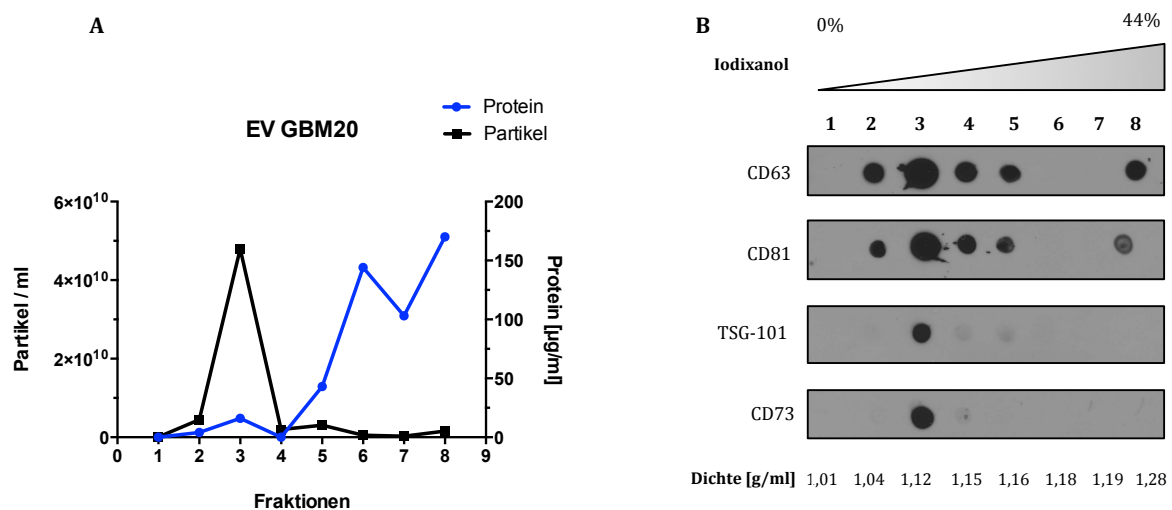


**Abbildung 25:** Analyse des zytoprotektiven Effekts von Adenosin auf OSU-CLL Zellen und primäre CLL-Zellen bei einer Behandlung mit Etoposid. Zellen wurden mit und ohne Blockierung von CD73 durch 22E6 (2,5 µg/ml) oder APCP (10 µM) mit AMP (200 µM) und Etoposid (50 µM) inkubiert. Der prozentuale Anteil lebender Zellen wurde durch eine Färbung mit Propidiumiodid und Annexin V bestimmt. **A:** OSU-CLL-Zellen (n=7). **B:** Primäre CD73-positive CLL-Zellen aus fünf Patienten. Daten sind in *Boxplots* inklusive der Standardabweichung und der statistischen Signifikanz dargestellt. Daten von Dr. Deaglio, Universität Turin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Blockierung von CD73 auf CLL-Zellen den zytoprotektiven Effekt des gebildeten Adenosins gegenüber Etoposid aufhebt. Die Blockierung von CD73 mit 22E6 war dabei genauso effektiv, wie mit dem chemischen Inhibitor APCP.

## 7.5 Nachweis von CD73 auf GBM20 EV

Da 22E6 aus einer Immunisierung mit GBM20-EV entstand, wurden diese EV im Folgenden näher untersucht. Dafür wurden EV aus GBM20-Kulturüberstand isoliert und über einen Dichtegradienten von freien Proteinen gereinigt. Alle Fraktionen wurden auf Proteingehalt nach 5.1.2.1 und Partikelkonzentration (5.2.8.2) sowie per Dot Blot auf verschiedene Vesikelmarker und CD73 getestet. Zusätzlich wurde von jeder Fraktion die Dichte bestimmt. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse aller Analysen.



**Abbildung 26:** Charakterisierung von GBM20-EV isoliert aus Kulturüberstand. EV wurden über serielle Zentrifugation sowie einen Dichtegradienten gereinigt. **A:** Analyse der einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten auf Proteingehalt mittels Bradford-Assay und auf Partikelkonzentration über NTA. **B:** Dot Blot Analyse aller Gradientenfraktionen auf Vesikelmarker CD63, CD81, TSG-101 sowie CD73. Zusätzlich wurde die Dichte aller Fraktionen mithilfe eines Refraktometers bestimmt.

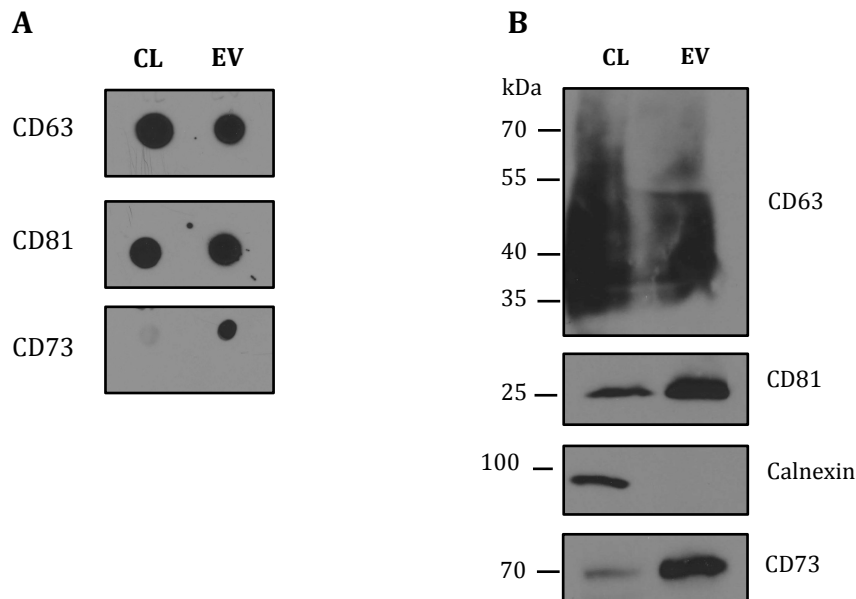
Die Analyse in Abbildung 26 zeigte, dass EV erfolgreich aus GBM20 Kulturüberstand isolierten worden waren. GBM20-EV wurden vermehrt in Fraktion zwei bis fünf des Gradienten sowohl durch die Bestimmung der Partikelanzahl, als auch über die Vesikelmarker CD63, CD81 und TSG-101 detektiert. Die dritte Fraktion zeigte hierbei die höchste Partikelkonzentration (Abbildung 26 A). Die Vesikelmarker CD63, CD81 und TSG-101 wurden hauptsächlich in den Fraktionen zwei bis vier zu detektiert. Diese Fraktionen wiesen zudem die erwartete Dichte für EV zwischen 1,04 und 1,15 g/ml auf [144, 145].

CD73 wurde hauptsächlich in Fraktion drei nachgewiesen. Da es sich hierbei um die Fraktion der höchsten EV-Konzentration handelt, konnte CD73 erfolgreich auf EV aus GBM20-Kulturüberstand nachgewiesen werden.

### **7.5.1 Aktivitätsbestimmung von CD73 auf GBM20 EV**

Nachdem in 7.4 CD73 auf GBM20-EV nachgewiesen werden konnte wurde im Folgenden untersucht, ob es sich hierbei um aktives Enzym handelt und ob die Aktivität durch 22E6 reduziert werden konnte. Für diese Analysen wurden EV aus GBM20 Kulturüberstand isoliert. Dabei wurde jedoch auf einen Dichtegradienten verzichtet, damit eine möglichst konzentrierte EV-Population eingesetzt werden konnte. Um die CD73-Aktivität auf EV über die Analyse der freigesetzten Phosphatmenge bestimmen zu können, wurden sie in phosphatfreiem HEPES-Puffer gewaschen und darin konzentriert. Nach der Isolierung wurden alle Präparationen mittels Dot Blot auf Vesikelmarker und CD73 überprüft.

Die Ergebnisse des Dot Blots wurden anschließend über Western Blot verifiziert. 20 µg GBM20-Zelllysat (CL) wurden im Western Blot als Kontrolle mitgeführt. Dabei diente Calnexin als Negativkontrolle für Vesikel, da es als Protein des Endoplasmatischen Retikulums nicht in EV nachweisbar sein sollte [140]. Zusätzlich wurde die Partikelkonzentration der gereinigten phosphatfreien EV wie in 5.2.8.2 beschrieben bestimmt.

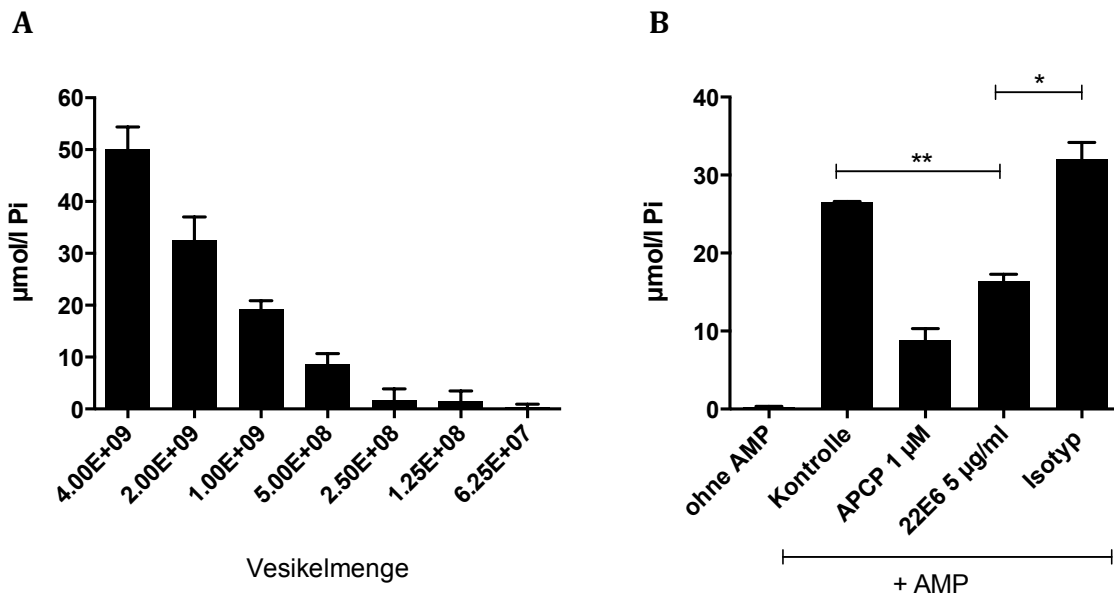


**Abbildung 27:** Nachweis von CD73 auf GBM20 EV. EV wurden ohne Dichtegradienten in phosphatfreien HEPES-Puffer aus GBM20-Kulturüberstand isoliert. **A:** Analyse der EV Präparationen auf Vesikelmarker CD63 und CD81 sowie CD73 per Dot Blot. Als Kontrolle diente GBM20-Zelllysate (CL). **B:** Analyse der Vesikelmarker CD63 und CD81 sowie CD73 auf GBM20-EV. Als Kontrolle wurden 20 µg GBM20-Zelllysate (CL) verwendet. Calnexin diente als Negativmarker für EV.

Die EV Präparationen zeigten sowohl in den Dot Blot, als auch in den Western Blot-Analysen positive Signale für die Vesikelmarker CD63 und CD81, als auch für CD73. Die Negativkontrolle Calnexin zeigte wie erwartet nur ein Signal im Zelllysate. Damit wurde das Vorkommen von CD73 auf GBM20 EV bestätigt. (Abbildung 27)

Um die CD73 Aktivität auf EV zu bestimmen, wurden verschiedene EV Mengen mit 100 µM AMP für eine Stunde inkubiert. Die Konzentration des durch enzymatische Spaltung freigesetzten Phosphats wurde nach 5.2.13.1 mithilfe des Malachitgrün-Assays bestimmt. Hierbei war es wichtig, EV ohne AMP ebenfalls in die Phosphatbestimmung einzusetzen, um evtl. Phosphatkontaminationen der EV-Präparationen zu detektieren. Die Aktivität von CD73 konnte erfolgreich auf GBM20 EV nachgewiesen werden (Abbildung 28 A). Es zeigte sich, dass mindestens  $5 \cdot 10^8$  EV in den Versuch eingesetzt werden mussten, um die entstandene Phosphatkonzentration detektieren zu können.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob 22E6 die enzymatische Aktivität von CD73 auf GBM20-EV ebenfalls inhibiert. Dazu wurden  $3 \cdot 10^9$  EV je Ansatz verwendet und mit 22E6 bzw. APCP inkubiert. Als Kontrolle dienten EV ohne Inhibitorzugabe. Nach der Zugabe von 100 µM AMP folgte die Bestimmung der CD73 Aktivität nach 5.2.13.1 mithilfe des Malachitgrün-Assays (Abbildung 28 B).



**Abbildung 28:** CD73-Aktivität auf GBM20-EV. **A:** Bestimmung der CD73 Aktivität mit unterschiedlichen EV-Mengen. **B:** CD73-Aktivität auf GBM20-EV unter Einfluss des chemischen Inhibitors APCP und 22E6. Als Kontrolle für eine phosphatfreie EV-Präparation wurden EV ohne AMP eingesetzt. Es sind die Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus biologischen Triplikaten dargestellt. Sterne markieren die jeweilige statistische Signifikanz.

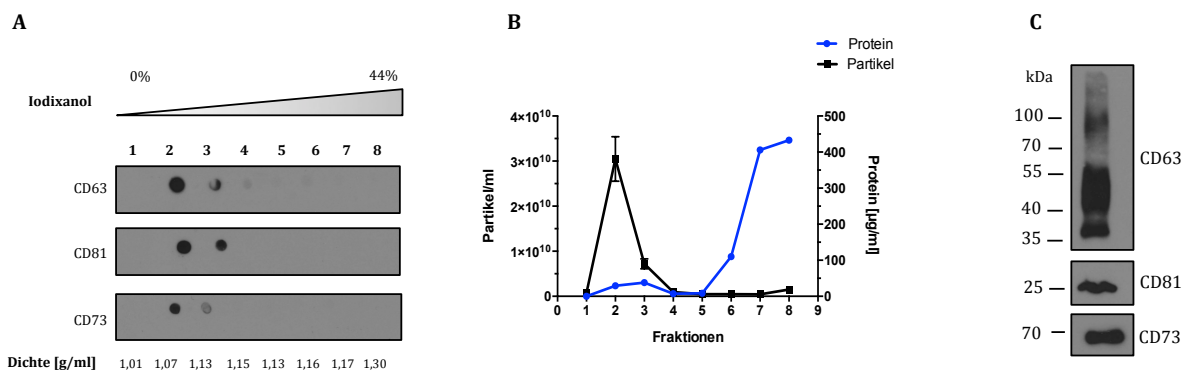
Abbildung 28 zeigt, dass CD73 auf GBM20 EV aktiv war und die Aktivität spezifisch durch 22E6 und APCP reduziert werden konnte (Abbildung 28).

## 7.6 CD73-Aktivität auf EV isoliert aus humaner Aszites

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass CD73 auf GBM20-EV aktiv war. Da es sich hierbei jedoch um ein artifizielles Modell handelt, wurden im folgenden EV aus Primärmaterial untersucht. Dazu wurden EV aus Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen isoliert. Die Aszitesproben wurden von Dr. Burges von der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Universität München zur Verfügung gestellt.

Die Vesikel wurden, wie in 5.2.8 beschrieben, aus Aszites isoliert. Anschließend folgte die Abtrennung freier Proteine über einen Dichtegradienten. Zur Kontrolle wurden alle Fraktionen durch einen Dot Blot auf die Vesikelmarker (CD81 und CD63) und CD73 analysiert.

Zusätzlich wurde die Dichte aller Fraktionen sowie die Partikelanzahl über NTA (5.2.8.2) und die Proteinmenge mittels Bradford-Assay bestimmt (Abbildung 29 A und B). EV befanden sich wie erwartet hauptsächlich in Fraktionen zwei und drei. Diese Fraktionen wurden vereinigt und in phosphatfreiem HEPES-Puffer gewaschen und konzentriert. Zur Überprüfung wurden EV über Western Blot erneut auf Vesikelmarker und CD73 untersucht. Abbildung 29 zeigt die Isolierung von EV aus Aszites beispielhaft an Aszites Nr. 40 (AS40).



**Abbildung 29:** Isolierung von EV aus humanem Aszites. EV wurden über serielle Zentrifugation und einen Dichtegradienten gereinigt, in phosphatfreiem HEPES-Puffer gewaschen und konzentriert. **A:** Analyse der EV aus AS40 per Dot Blot auf Vesikelmarker CD63 und CD81 sowie auf CD73. Zusätzlich wurde die Dichte jeder Fraktion bestimmt. **B:** Analyse der Partikel- und Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten. **C:** Western Blot Analyse der vereinigten und gewaschenen Fraktionen zwei und drei des Dichtegradienten auf Vesikelmarker CD63, CD81 sowie auf CD73.

Abbildung 29 zeigt die erfolgreiche Reinigung von EV aus Aszites. Dies konnte sowohl über die Vesikelmarker anhand der Dot Blot- und Western Blot-Analysen bestätigt werden. Zusätzlich zeigte die Bestimmung der Partikelkonzentrationen, dass in diesen Fraktionen die Partikelanzahl am höchsten war. Freie Proteine hingegen wurden hauptsächlich in den hinteren Fraktionen sechs bis acht detektiert, was für eine saubere Trennung von EV und freien Proteinen spricht. CD73 konnte ebenfalls durch obige Analysen auch auf EV aus AS40 nachgewiesen werden

In einem nächsten Schritt wurde nun getestet, ob CD73 auf diesen Vesikeln ebenfalls aktiv ist und von 22E6 inhibiert werden kann. Dazu wurden verschiedene Mengen an EV in den CD73-Aktivitätstest eingesetzt. Es wurden 100 µM AMP dazu gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatkonzentration durch den Malachitgrün-Assay bestimmt (Abbildung 30 A und B).



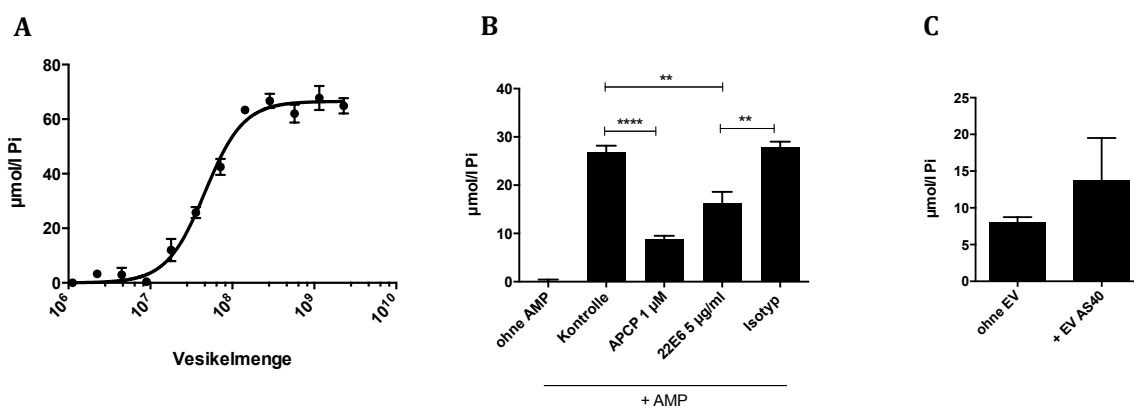
Die Ergebnisse in Abbildung 30 A zeigten, dass CD73 auch auf AS40 EV aktiv war. Um die Aktivität bestimmen zu können, sollten mindestens  $1 \cdot 10^7$  EV eingesetzt werden. Da ab einer Phosphatkonzentration von ca.  $60 \mu\text{M}$  das Detektionslimit des Malachitgrün-Assays erreicht war, sollten maximal  $1 \cdot 10^9$  EV aus AS40 verwendet werden.

Um den Effekt von 22E6 auf die CD73-Enzymaktivität auf EV aus AS40 zu untersuchen, wurden  $2 \cdot 10^8$  EV eingesetzt und mit 22E6 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) bzw. dem chemischen CD73 Inhibitor APCP ( $1 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Zusätzlich wurden EV ohne Inhibitor und auch ohne AMP-Zugabe eingesetzt. Letzteres diente als Kontrolle, dass die EV-Präparation frei von Phosphat war und somit keine falsch positiven Resultate der CD73-Aktivitätsbestimmung entstanden. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden  $100 \mu\text{M}$  AMP hinzugegeben und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die entstandene Phosphatkonzentration über den Malachitgrün-Assay bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die CD73-Aktivität auf EV aus AS40 durch 22E6 reduziert werden kann. Die Inkubation der EV mit 22E6 führt zu einer hoch signifikanten Reduktion der CD73-Enzymaktivität. Die Spezifität dieses Effekts konnte durch den Einsatz des Isotypkontrollantikörpers nachgewiesen werden, da er keinen Einfluss auf die CD73-Aktivität zeigte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die EV-Präparation frei von Phosphat war, da ohne AMP-Zugabe kein Phosphat detektiert werden konnte (Abbildung 30 B).

Nachdem die Aktivität von CD73 auf EV aus AS40 nachgewiesen werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt analysiert, ob diese EV aktives CD73 auf andere Zellen übertragen können. Für diese Experimente wurde die CD73-negative Zelllinie T47-D als Zielzelle verwendet (siehe Abbildung 19). Davon wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen in einer 24-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden je Ansatz  $3 \cdot 10^9$  EV aus AS40 hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen ohne EV-Zugabe.

Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen gründlich mit Glukosepuffer gewaschen und die CD73-Aktivität wie in 5.2.13 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 C dargestellt. Es zeigte sich, dass T47-D Zellen, die mit CD73-positiven EV inkubiert worden waren, nun CD73-Aktivität aufwiesen. Bei unbehandelten Zellen konnte lediglich eine minimale Phosphatmenge von ca. 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  detektiert werden. Da in Abbildung 19 schon gezeigt wurde, dass T47-D-Zellen kein CD73 exprimierten, handelte es sich hierbei wohl nur um minimale Phosphatreste im Glukosepuffer. Durch die Behandlung mit CD73-positiven EV aus Aszites ließ sich in diesem Experiment die CD73-Aktivität nahezu verdoppeln.



**Abbildung 30:** Analyse der CD73-Aktivität auf EV aus AS40. Die Vesikel wurden über serielle Zentrifugation, sowie einen Dichtegradienten gereinigt und in phosphatfreiem Puffer konzentriert. Die CD73-Aktivität wurde über die Quantifizierung der freigesetzten Phosphatmenge bestimmt. **A:** Analyse der CD73-Aktivität mit verschiedenen EV-Mengen. **B:** Bestimmung der CD73-Aktivität auf EV aus AS40 unter Einfluss der CD73-Inhibitoren 22E6 und APCP. Als Kontrolle für die phosphatfreie Vesikelpräparation diente eine Kontrolle ohne AMP Zugabe. Zusätzlich wurden Vesikel ohne Inhibitoren sowie der Isotypkontrollantikörper mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt. **C:** Übertragung der CD73-Aktivität von EV aus AS40 auf CD73-negative T47-D-Zellen. Als Kontrolle wurden Zellen ohne EV Zugabe eingesetzt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus biologischen Triplikaten inkl. Standardabweichung angegeben. Sterne markieren die statistische Signifikanz.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuchsteil gezeigt werden, dass EV aus Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen aktives CD73 tragen. Diese Aktivität konnte durch 22E6 reduziert werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass durch EV aus primärem Aszites aktives CD73 auf andere Zellen übertragen werden konnte. Diese Ergebnisse wurden mit EV einer weiteren Aszitesprobe verifiziert (Daten nicht gezeigt).

## 8 Diskussion

### 8.1 Carboanhydrase IX- und XII-Inhibitoren in der Tumorthherapie

Die beiden membranständigen Carboanhydrasen IX und XII sind aufgrund ihrer Rolle bei der Tumorprogression sowie ihrer Überexpression auf Krebszellen wichtige Zielmoleküle in der Tumorthherapie. Daher ist die Entwicklung von Carboanhydrase-Inhibitoren Gegenstand vieler Studien. Aufgrund ihrer starken Affinität kommen dabei besonders Sulfonamide, wie Acetazolamid oder Methazolamid zum Einsatz [27, 55, 146]. Erste Daten aus verschiedenen Mausmodellen konnten einen antitumoralen Effekt der CAIX-Inhibierung durch Sulfonamide zeigen [34, 35]. Des Weiteren führte die Inhibierung von CAIX mit Nitroimidazol-basierten Sulfonamiden zu einem verbesserten therapeutischen Effekt der Tumorbestrahlung [147, 148]. Um spezifisch die tumorassoziierten Carboanhydrasen IX und XII zu inhibieren, wurden Sulfonamide durch Modifikationen, beispielsweise durch das Anhängen von Zuckerresten, hydrophilisiert, wodurch sie die Plasmamembran nicht mehr durchdringen können und nur noch die membranständigen Carboanhydrasen blockieren [34, 35, 149].

Die Therapie mit spezifischen inhibierenden anti-CAIX oder anti-CAXII Antikörpern ist ein neuer Ansatz in der Tumorthherapie. Der Vorteil monoklonaler Antikörper gegenüber *small molecule*-Inhibitoren wie den Sulfonamiden, ist ihre höhere Spezifität. Durch die spezifischere Inhibierung einer bestimmten Subklasse der Carboanhydrasen lässt sich das Ausmaß an möglichen Nebenwirkungen minimieren, was sie geeigneter für die klinische Anwendung macht. Zudem können durch Antikörper Immuneffektorfunktionen, wie eine Antigeninternalisierung oder eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) induziert werden. Durch Kopplung mit Zytostatika oder Radionukliden kann zudem die Antikörperwirkung verstärkt werden [48].

Die Gruppe um Pastorekova entwickelte einen anti-CAIX spezifischen inhibierenden Antikörper (M75), welcher die PG-Domäne der CAIX bindet und häufig zur immunhistologischen Analyse der CAIX-Expression eingesetzt wird [150].

Der anti-CAIX Antikörper G250 (Girentuximab, RENCAREX®) bindet ebenfalls die PG-Domäne und wird bereits hauptsächlich zur diagnostischen Bildgebung verwendet. Zusätzlich wurde G250 zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen in klinischen Studien getestet [135]. Da M75 und G250 nicht das aktive Zentrum direkt binden, wird die enzymatische Aktivität der Carboanhydrasen nicht beeinflusst, wodurch der therapeutische Effekt der Antikörper limitiert ist.

6A10 und der CAIX-spezifische Antikörper MSC-8 jedoch inhibieren jeweils die Enzymaktivität von CAXII beziehungsweise von CAIX und führten *in vitro* und *in vivo* zu einem reduzierten Tumorwachstum. Daher zeigen sie größeres Potential zur Anwendung in der Tumorthherapie [59, 135].

CAIX und CAXII werden auf vielen Tumoren koexprimiert. Chiche *et al.* zeigten schon, dass der genetische *knock-down* von CAIX zu einer gesteigerten CAXII-Expression führt [134]. Diese Kompensationseffekte zur Homöostase des pH<sub>i</sub> wurden in dieser Arbeit untersucht und sollten durch eine kombinatorische Therapie von 6A10 und MSC-8 umgangen werden. Die Ergebnisse der *in vitro* Analysen zeigten, dass die Kombination aus 6A10 und MSC-8 einen verstärkten negativen Einfluss auf das Wachstum der Lungenkarzinomzelllinie A549 hatte (Abbildung 5). Da A549-Zellen erst unter Hypoxie CAIX exprimieren, konnte dieser Effekt unter Standardkulturbedingungen nicht beobachtet werden. Erst die Inkubation der Zellen unter hypoxischen Bedingungen führte zur Induktion der CAIX-Expression, was die Regulation der CAIX-Expression durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 verifizierte [34]. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch mit anderen Zelllinien, wie der Pankreaskarzinomzelllinie Aspc-1 nicht bestätigen. Hier führte nur die Inkubation mit MSC-8 im Sphäroidmodell zu einer Reduktion der Zellviabilität. Es konnte jedoch kein additiver Effekt durch die Kombination beider Antikörper festgestellt werden (Abbildung 6 B). Die Kombinationstherapie von 6A10 und MSC-8 zeigte zudem in einem *residual disease* Tiermodell ebenfalls keinen nennenswerten therapeutischen Effekt (Abbildung 7).

Aspc-1-Zellen sprechen *in vitro* als auch *in vivo* schlechter auf die Therapie mit 6A10 und MSC8 an. Die pH<sub>i</sub>-Regulation in Aspc-1-Zellen scheint, verglichen mit A549-Zellen, weniger stark von der Expression von CAIX und CAXII abhängig zu sein. Um dies zu klären müssten weitere Proteine, die an der pH<sub>i</sub>-Regulation beteiligt sind, wie Bikarbonattransporter, V-ATPasen oder Ionenaustauscher, analysiert und verglichen werden [18].

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Sensitivität der beiden Tumorzelllinien auf die Therapie mit 6A10 oder MSC-8 könnte auch eine Kompensation durch andere Carboanhydrasen, wie die ebenfalls membranständigen CAIV und CAXIV, sein [18].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Expressionsniveaus von CAIX und CAXII nicht indikativ für eine erfolgreiche Therapie mit 6A10 und MSC-8 sind. Weitere Analysen sind nötig um Biomarker zu identifizieren, welche Aussagen über einen Therapieerfolg einer CAIX- und CAXII-Inhibierung und damit eine Stratifikation von Tumorpatienten ermöglichen.

## **8.2 Sensitivierung chemoresistenter Mammakarzinomzellen gegenüber Anthrazyklinen durch 6A10**

Die Gruppe um Chiara Riganti zeigte, dass viele chemoresistente Tumorzellen den MDR-Transporter P-GP und CAXII koexprimieren. In verschiedenen Experimenten konnten sie nachweisen, dass CAXII und P-GP physisch interagieren und ein genetischer *knock-down* der CAXII-Expression zu einer verminderten Chemoresistenz führt [62]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit der Effekt einer spezifischen Inhibierung von CAXII durch 6A10 auf Chemoresistenz der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 detailliert untersucht. Diese Zelllinie exprimiert sowohl CAXII als auch P-GP (Abbildung 8). Um den Effekt von 6A10 zu analysieren wurden neben der intrazellulären Akkumulation der Anthrazykline Doxorubicin und Daunorubicin auch deren zytotoxische Effekte sowie die Aktivität von P-GP untersucht.

Dabei wurde deutlich, dass die Zugabe von 6A10 zu einer signifikanten Steigerung der intrazellulären Konzentration beider Anthrazykline führte und folglich die zytotoxische Wirkung beider Therapeutika deutlich verstärkt werden konnte (Abbildung 9 A und B). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Blockierung von CAXII durch 6A10 Einfluss auf die Funktion von P-GP zu haben scheint. Diese Hypothese konnte durch die Analyse der Aktivität von P-GP unter Einfluss von 6A10 bestätigt werden (Abbildung 9 C). Dabei zeigte sich, dass 6A10 die P-GP-Aktivität merklich reduziert, wodurch die Relevanz von CAXII bei der Entstehung eines chemoresistenten Phänotyps verdeutlicht werden konnte.

Wie genau CAXII Einfluss auf die Funktion von P-GP nimmt ist noch unklar und müsste daher in weiteren Experimenten untersucht werden. Es wäre möglich, dass eine Inhibierung der CAXII zu einer lokalen Änderung des intrazellulären pH-Wertes führt und damit die Funktion von P-GP beeinträchtigt.

Nachdem *in vitro* ein Zusammenspiel von CAXII und P-GP bei der Chemoresistenz von Brustkrebszellen gezeigt werden konnte, wurde ein orthotopes Brustkrebsmodell etabliert, um diesen Zusammenhang *in vivo* analysieren zu können.

Die Auswertung dieses Experiments zeigte, dass die Kombinationstherapie von Doxorubicin und 6A10 zwar keinen Effekt auf solide Tumoren hat, jedoch die Zahl an Metastasen im Thoraxbereich signifikant reduzierte (Abbildung 11). Mithilfe der hochauflösenden dreidimensionalen Ganzkörpermikroskopie konnte gezeigt werden, dass metastasierende Tumorzellen zuerst in die axillaren Lymphknoten und dann in die Lunge invadierten (Abbildung 13). Die reduzierte Anzahl an Lungenmetastasen konnte anhand der mikroskopischen Analysen verifiziert werden (Abbildung 14).

Diese Ergebnisse lassen sich eventuell damit begründen, dass der Antikörper aufgrund der Größe nicht tief genug in den soliden Tumor eindringen konnten, um den therapeutischen Effekt zu vermitteln. Deshalb hatte 6A10 nur auf einzelne disseminierte Tumorzellen einen Effekt, was sich in der Reduktion metastasierten Tumorzellen in der Lunge und in axillaren Lymphknoten widerspiegelte.

Die Verwendung der kleineren Fab-Fragmente des Antikörpers (Fab-6A10) zielte darauf hin, eine bessere Tumorpenetration und dadurch auch einen verstärkten Effekt der Kombinationstherapie auf den Primärtumor erzielen zu können. Interessanterweise hatte jedoch weder die Behandlung mit Fab-6A10 alleine, noch in Kombination mit Doxorubicin einen Effekt auf den Primärtumor oder einzelne Tumormetastasen. Da Fab-6A10 CAXII im selben Maße bindet und inhibiert (Daten nicht gezeigt), lässt sich dies möglicherweise durch die verminderte Plasmahalbwertszeit von Fab-Fragmenten begründen. Sie sind deutlich instabiler und können aufgrund der verringerten Größe zwar tiefer in Gewebe eindringen, werden aber dadurch auch schneller durch die Nieren absorbiert und ausgeschieden [119]. In diesem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine systemische Therapie mit Fab-Fragmenten in der Klinik also nicht von Vorteil ist und eventuell in einer lokalen Applikation direkt an die Tumorstelle bessere Ergebnisse erzielt werden können.

Dieses präklinische Tumormodell bietet zusammen mit den *in vitro* Daten eine wichtige Basis für die Entwicklung neuer Ansätze zur Behandlung von chemoresistentem Brustkrebs.

Resistenzen stellen ein enormes Problem bei der Tumorthherapie dar. Daher werden viele neue Medikamente entwickelt, um gezielt die Funktion von P-GP zu blockieren und damit die Effizienz von Chemotherapeutika zu steigern. Die erste Generation von P-GP-Inhibitoren, wie zum Beispiel Verapamil oder Cyclosporin A, wurde bereits in den 1980ern entwickelt. Viele dieser Inhibitoren zeigten *in vivo* nur eine schwache Wirkung, da sie selbst als P-GP-Substrat fungierten und über kompetitive Hemmung die Aktivität minderten [151]. Aufgrund der teilweise geringen Bindeaffinität mussten diese Inhibitoren in hohen Dosen eingesetzt werden, was zu einer hohen Toxizität führte, weshalb sie nur bedingt zur Therapie verwendet werden konnten [152]. P-GP-Inhibitoren der zweiten Generation, wie Dexverapamil oder Valspodar, weisen eine stärkere Affinität auf, zeigten jedoch auch nur moderate klinische Erfolge und führten aufgrund pharmakokinetischer Probleme ebenfalls zu hohen Zytotoxizitäten [152]. Die darauf entwickelten P-GP-Inhibitoren der dritten Generation zeichnen sich durch eine hohe Bindeaffinität aus und führten nicht zu starken Nebenwirkungen [151, 152]. Dazu gehört unter anderem Tariquidar, das derzeit in klinischen Studien getestet wird [153]. Verglichen mit *small molecule*-Inhibitoren hat eine Antikörpertherapie jedoch den Vorteil, dass zusätzliche Immuneffektorfunktionen, wie ADCC oder CDC vermittelt werden und zum Therapieerfolg beitragen könnten [121]. Versuche im Rahmen dieser Arbeit haben die funktionale Rolle von CAXII bei der P-GP vermittelten Chemoresistenz verifiziert. Die Kombinationstherapie aus einem Chemotherapeutikum und 6A10 bietet deshalb eine neue Möglichkeit, den Therapieerfolg resistenter Tumorerkrankungen zu steigern, da eine Reduktion disseminierter resistenter Tumormetastasen erzielt werden kann. Weitere Studien sind jedoch nötig, um diese präklinischen Daten an Patienten klinisch anwenden und verifizieren zu können.

### 8.3 6A10 reduziert das Tumorwachstum in einem orthotopen Glioblastommodell

Wie bereits beschrieben zeichnen sich maligne Hirntumoren durch eine hohe Expression von CAXII aus. Da das gesunde Hirngewebe keine CAXII exprimiert, bietet sich eine Therapie mit 6A10 besonders für die Behandlung von Glioblastomen an [57, 139]. Zunächst wurde die Expression von CAXII auf vier verschiedenen primären Glioblastomzelllinien bestätigt (Abbildung 15). Für die *in vivo* Analysen wurde die Linie GBM20 gewählt, da sie die stärkste CAXII-Expression, aber keine CAIX-Expression zeigte. Dies änderte sich auch nicht durch die Inkubation der Zellen unter Hypoxie (Daten nicht gezeigt). Dadurch kann eine mögliche Kompensation von CAIX durch die Blockierung von CAXII ausgeschlossen werden.

Um einen möglichen therapeutischen Effekt von 6A10 *in vivo* zu untersuchen, wurde ein orthotopes Glioblastommodell gewählt, in dem der Antikörper über eine mikroosmotische Pumpe kontinuierlich intratumoral appliziert wurde. Dies führte zu einem reduzierten Tumolvolumen, zusätzlich wurde die Invasivität der Tumorzellen signifikant reduziert (Abbildung 16 und Abbildung 17).

Glioblastome sind allgemein durch stark invasives Wachstum gekennzeichnet. Dies stellt bei der Therapie ein großes Problem dar, da nach chirurgischer Resektion des Haupttumors einzelne invadierte Zellen relativ schnell zu Lokalrezidiven führen [154].

Dies könnte durch eine adjuvante lokale Applikation von 6A10 nach der Resektion des Haupttumors über ein Ommaya-Reservoir therapiert werden [155]. Die Wirksamkeit könnte durch die Verwendung von Fab-6A10 noch verbessert werden, da durch die verringerte Größe des 6A10-Fragments ein tieferes Eindringen in das Gewebe gewährleistet werden könnte. Durch die lokale Applikation kann außerdem ein schnelles Ausscheiden der Fab-Fragmente über die Niere minimiert werden.

6A10 ist zudem ein geeigneter therapeutischer Antikörper für die Radio- oder Chemoimmuntherapie von Glioblastomen. In unserer Arbeitsgruppe wird daran gearbeitet Fab-6A10 an <sup>177</sup>Lutetium zu koppeln (Fab-6A10-<sup>177</sup>Lu) und im Rahmen einer klinischen Studie zu testen. Dabei soll Glioblastompatienten nach der Resektion des Haupttumors Fab-6A10-<sup>177</sup>Lu in die Resektionshöhle appliziert werden, um residuale Tumorzellen zu behandeln. Zusätzlich zur Wirkung von 6A10 kommt es dadurch zur zielgerichteten Bestrahlung der Tumorzellen, wodurch die Nebenwirkungen auf umliegende gesunde Zellen minimiert werden können.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine adjuvante Behandlung mit 6A10 großes Potential in der Therapie chemoresistenter Tumoren haben könnte. Durch diese Therapie kann nicht nur die Zellproliferation durch Eingriff in die pH-Wert-Homöostase verringert werden, sondern auch die Wirkung der Chemotherapeutika verstärkt und die Metastasierung resistenter Zellen verringert werden. Da bisher 90 % aller Todesfälle von Krebspatienten auf Metastasierung der Tumorzellen zurückzuführen sind, bedarf es dringend der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten [156]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu verstehen, weshalb 6A10 auf manche Tumorzellen antitumorale Effekte vermittelt, auf andere hingegen nicht. Um genaue Aussagen über den Therapieerfolg und mögliche Nebenwirkungen von 6A10 treffen zu können, müssen diese präklinischen Daten in klinischen Studien an Patienten verifiziert werden

#### **8.4 Inhibition von CD73 in der Tumorthherapie**

Die Blockierung von CD73 ist ein vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie. Da extrazelluläres Adenosin nicht nur die Immunevasion von Tumorzellen fördert, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Tumorzellproliferation und Neoangiogenese spielt, können durch die Blockierung von CD73 unterschiedlichste Effekte ausgelöst werden [74]. Dazu zählt neben der reduzierten Stimulation der Angiogenese und Zellproliferation auch die Aktivierung von Leukozyten im Tumormilieu, wie CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder Makrophagen. Zusätzlich resultiert die reduzierte Adenosinkonzentration im Tumormilieu in einer verminderten Rekrutierung von myeloiden Suppressorzellen und Tregs [89, 157]. Zudem ist CD73 an der Metastasierung und Chemoresistenz von Tumorzellen beteiligt [85, 87, 88].

Ein Ansatz der therapeutischen CD73 Inhibition ist die Entwicklung von *small molecule*-Inhibitoren, welche durch kompetitive Inhibition das aktive Zentrum des Enzyms blockieren [158]. Der potenteste Inhibitor APCP führte in Mausmodellen zu einer Reduktion des Tumorwachstums, konnte bisher jedoch aufgrund der Zytotoxizität und Nebenwirkungen nicht klinisch eingesetzt werden [74]. Prinzipiell zeigen diese Inhibitoren eine gute orale Bioverfügbarkeit und können aufgrund des geringen Molekulargewichts leicht in Gewebe eindringen oder physiologische Barrieren, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke durchdringen.

Allerdings weisen sie eine relativ geringe Substratspezifität auf, wodurch ungewollte *off-target*-Effekte, wie die Blockierung anderer Ecto-Nukleotidasen oder ADP-Rezeptoren entstehen können [77, 158].

Eine wichtige Entwicklung sind daher inhibitorische anti-CD73 Antikörper, die eine höhere Substratspezifität und eine längere Plasmahalbwertszeit aufweisen. Dadurch kann mit einer geringeren Konzentration an Therapeutikum gearbeitet werden. Dies spiegeln auch die Versuche dieser Arbeit wider. APCP inhibierte die CD73-Enzymaktivität in einem Bereich zwischen 1-10  $\mu\text{M}$ , wohingegen 22E6 die maximale Inhibition mit nur 5  $\mu\text{g/ml}$  erreichte, was ca. 33 nM entspricht (Abbildung 20). 22E6 konnte also in deutlich geringeren Konzentrationen eingesetzt werden, um die enzymatische Funktion zu inhibieren.

Neben der Reduktion der extrazellulären Adenosinkonzentration durch die CD73-Inhibierung können durch Antikörper weitere zytotoxische Effekte, wie ADCC, CDC oder zellvermittelte Phagozytose vermittelt werden. Es zeigte sich, dass die durch einen anti-CD73 Antikörper vermittelte Antigeninternalisierung *in vivo* ebenfalls zu reduzierter Metastasierung von Brustkrebszellen führt, ohne die katalytische Aktivität von CD73 zu beeinflussen [159].

22E6 ist einer der wenigen humanspezifischen CD73-inhibierenden Antikörper. Geoghegan *et. al.* stellen den anti-CD73 Antikörper MEDI9447 vor, welcher ebenfalls CD73 durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus inhibiert [160]. Die antitumorale Wirkung dieses Antikörpers wird derzeit in einer klinischen Phase I untersucht [77, 157]. In vielen weiteren publizierten präklinischen Tumormodellen wird jedoch mit mausspezifischen CD73-inhibierenden Antikörpern gearbeitet um murine Tumoren zu therapieren [77]. Dort konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der extrazellulären Adenosinkonzentration durch die CD73-Inhibierung die Wirkung anderer Immuntherapien fördert. Besonders die Inhibierung anderer *immune checkpoints* konnte verbessert werden. Dazu zählt die anti-CTLA-4-Therapie mit Ipilimumab, welche durch das Blockieren von CTLA-4 zu einer Aktivierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen führt und bereits seit 2010 zur Therapie von Melanomen zugelassen ist [161, 162]. Die Blockierung von CD73 verbesserte aber auch die Therapie von Nivolumab, welcher PD-1 bindet und blockiert und dadurch die Suppression tumorspezifischer T-Zellen aufhebt. Nivolumab wird unter anderem alleine oder in Kombination mit Ipilimumab zur Therapie von metastasierenden Melanomen eingesetzt [163].

Eine Kombinationstherapie verschiedener *immune checkpoint*-Inhibitoren birgt viel Potential und kann sehr effektiv sein, verstärkt aber auch das Risiko von Nebenwirkungen. Da alle *immune checkpoints* eine unkontrollierte Immunantwort unterbinden, kann die Inhibition mehrerer solcher Rezeptoren unter Umständen zur Induktion einer supraphysiologischen Immunaktivierung und Autoimmunerkrankungen, wie Colitis oder Dermatitis führen [77, 164].

#### **8.4.1 Der Antikörper 22E6 inhibiert die CD73-Enzymaktivität auf Tumorzellen**

In dieser Arbeit wurde erfolgreich der inhibitorische humanspezifische anti-CD73 Antikörper 22E6 durch eine Immunisierung mit EV aus einer Glioblastomzelllinie etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass 22E6 die Enzymaktivität der Glioblastomzelllinie U138 MG mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 0,5 µg/ml inhibierte. Dies konnte auf weiteren Zelllinien verifiziert werden (Abbildung 20). Die Spezifität sowie die inhibitorischen Eigenschaften von 22E6 konnten zusätzlich durch die Analyse von rekombinantem CD73 auf 293T/CD73-Zellen bestätigt werden (Abbildung 21).

In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass die Reduktion der enzymatischen Aktivität durch 22E6 auch Auswirkungen auf Tumorzellen hat. In Kooperation mit Dr. Deaglio der Universität Turin wurde der Effekt von 22E6 auf primäre CLL-Zellen von Patienten untersucht. Wie erwartet reduzierte die Inkubation von CLL-Zellen mit 22E6 die enzymatische Aktivität von CD73, was einerseits anhand der unveränderten extrazellulären AMP-Konzentration, andererseits auch durch die verringerte extrazelluläre Adenosinkonzentration verifiziert wurde (Abbildung 24). Zusätzlich konnte die von Serra *et al.* beschriebene Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika durch die Inhibierung von CD73 erreicht werden [86]. Dabei erwies sich 22E6 genauso wirksam, wie der chemische Inhibitor APCP. Dies konnte sowohl an einer CLL-Modellzelllinie, als auch auf primären CLL-Zellen bestätigt werden (Abbildung 25).

#### 8.4.2 Inhibierung von CD73 durch 22E6 auf Tumor-EV

Tumorzellen sezernieren CD73 auch in Form von EV. Da der Antikörper 22E6 aus einer Immunisierung mit GBM20-EV entstand, wurde die Wirkung von 22E6 auf CD73-positive EV detailliert analysiert. Es zeigte sich, dass CD73 auf der Oberfläche von GBM20-EV (Abbildung 27 und Abbildung 28) und auf EV isoliert aus malignem Aszites nachweisbar und enzymatisch aktiv ist (Abbildung 29 und Abbildung 30 A, B). Diese Aktivität konnte erfolgreich durch 22E6 inhibiert werden.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass vesikuläres CD73 nicht nur aktiv ist, sondern die Aktivität auch auf CD73-negative Zellen übertragen werden kann (Abbildung 30 C). Aktives CD73 auf der Oberfläche von Tumor-EV spielt eine wichtige Rolle bei der tumorinduzierten Immunsuppression [165, 166]. Da Adenosin nur eine kurze Halbwertszeit besitzt, ist eine Übertragung und Verteilung im Tumormilieu über längere Strecken nicht möglich [78]. Dies kann jedoch durch CD73 positive EV kompensiert werden. EV sind stabil und können eine Verteilung von Adenosin sowohl lokal im Tumormilieu als auch über größere Distanzen gewährleisten [167]. Verschiedene Studien belegen, dass CD73 positive Tumor-EV die Aktivität von tumorinfiltrierenden T-Zellen inhibieren und somit direkt Einfluss auf die Immunevasion von Tumorzellen nehmen können [107, 168].

Neben zellulärem CD73 sind auch CD73-positive Tumor-EV bei der Metastasierung von Tumorzellen von Bedeutung. Dabei ist die Freisetzung von extrazellulärem Adenosin und die Aktivierung von A2A-Rezeptoren auf Tumorzellen entscheidend [74]. Im Allgemeinen zeigen bestimmte Tumorarten Metastasierungspräferenzen zu bestimmten Organen. Stephen Paget stellte 1889 dazu die *seed and soil*-Theorie auf, in welcher er beschrieb, dass das Zusammenspiel von Tumorzellen und der Mikroumgebung von sekundären Organen die Metastasierung in bestimmte Organe zu steuern scheint [169, 170]. Die prämetastatische Nische an sekundären Organen erleichtert dabei die Einnistung von Tumormetastasen. Sie wird von Zellen des Primärtumors durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verändert, sodass das Anwachsen von Tumormetastasen begünstigt wird [171]. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Tumor-EV durch die Expression und die Übertragung von Tumormarkern an der Bildung einer prämetastatischen Nische beteiligt sind [77].

Die CD73-positiven EV können dabei zur Anreicherung von immunsupprimierendem Adenosin beitragen und somit das Anwachsen von Metastasen begünstigen [74].

### 8.4.3 22E6 blockiert kein lösliches CD73

Da CD73 nicht nur als membranständiges Protein, sondern auch als lösliche Form vorkommt, wurde der Effekt von 22E6 auf lösliches CD73 untersucht [75]. Interessanterweise zeigten diese Analysen, dass 22E6 die lösliche Form von CD73 zwar bindet, aber dessen Funktion nicht inhibiert (Abbildung 23).

Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, da sich die membranständige und die lösliche Form nur durch einen GPI-Anker unterscheiden [76]. Der chemische Inhibitor APCP hatte sowohl auf lösliches, als auch auf membranständiges CD73 einen inhibitorischen Effekt. Auch der zuvor beschriebene Antikörper MEDI9447 inhibiert beide Formen [160]. Die Funktion des löslichen CD73 ist nicht genau bekannt. Es wurde jedoch beschrieben, dass lösliches CD73 eine Rolle bei der Plättchenaggregation spielt und bei der Zytoprotektion der Lunge und der Nieren beteiligt ist [172-174]. Außerdem wurden bei Patienten mit akuten Entzündungen, wie beispielsweise Pankreatitis, erhöhte Plasmalevel von löslichem CD73 festgestellt [175]. Die Tatsache, dass 22E6 lösliches CD73 nicht inhibiert, könnte sich daher möglicherweise positiv auf die Therapie auswirken. Da die Datenlage über lösliches CD73 jedoch sehr gering ist, kann darüber keine definitive Aussage getroffen werden.

Auffällig bei allen Experimenten war, dass trotz einer Erhöhung der Antikörperkonzentration die Enzymaktivität von membranständigem CD73 auf Zellen oder EV durch 22E6 nie vollständig inhibiert werden konnte. Der chemische Inhibitor APCP jedoch führte bei Konzentrationen von 10  $\mu$ M fast zur vollständigen Enzyminhibition. Um die Restaktivität von CD73 trotz Bindung von 22E6, aber auch die fehlende inhibitorische Wirkung auf lösliches CD73 zu erklären, müsste der Inhibitionsmechanismus des Antikörpers detaillierter untersucht werden. Bisher ist unbekannt welches Epitop 22E6 bindet. Möglicherweise kommt es durch die Bindung von 22E6 während der enzymatischen Reaktion zu einer sterischen Inhibierung der Konformationsänderung, wodurch die AMP-Hydrolyse beeinträchtigt, aber nicht vollständig inhibiert wird. Die lösliche Form von CD73 wird unter Umständen aufgrund der fehlenden Verankerung in der Plasmamembran durch die Bindung von 22E6 nicht mehr sterisch gehindert, wodurch die enzymatische Reaktion trotz Bindung ablaufen kann.

Es sind weitere Analysen, wie die Aufklärung der Kokristallstruktur von CD73 und 22E6 in Planung, um detailliertere Aussagen über die Interaktion beider Proteine treffen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Antikörper 22E6 bislang einmalige Eigenschaften besitzt und sich von anderen blockierenden anti-CD73 Antikörpern unterscheidet. Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass sich 22E6 für die Tumorthherapie eignen könnte.

## **8.5 Limitationen und Schwierigkeiten der Antikörpertherapie**

In dieser Arbeit wurden zwei Antikörper vorgestellt, die großes Potential für die Anwendung in der Tumorthherapie zeigen. Jedoch stößt auch die Immuntherapie an ihre Grenzen und muss trotz vielversprechender Erfolge differenziert betrachtet werden.

Ein kritischer Punkt tritt bereits bei der Entwicklung neuer Therapien in präklinischen Tiermodellen auf. Durch die experimentelle Limitation der Tiermodelle lassen sich oft nur bedingt Aussagen über die Wirksamkeit von Immuntherapien treffen. Da Tumormodelle mit humanen Xenotransplantaten nur in immunsupprimierten Mäusen analysiert werden können, können dabei beispielsweise keine Angaben über die Interaktion von humanspezifischen Antikörpern mit Immunzellen oder über unspezifische Bindungen des Antikörpers an gesunde Zellen gemacht werden. Aufgrund dessen können nur bedingt Aussagen über die Wirksamkeit von Antikörpern sowie dessen Nebenwirkungen gemacht werden. Dies erschwert deshalb das Extrapolieren präklinischer Daten und Modelle auf den Patienten. Generell sind Therapien mit monoklonalen Antikörpern spezifischer als konventionelle Chemotherapien und verursachen dadurch weniger Nebenwirkungen. Trotzdem kann eine Therapie mit Antikörpern zu unerwünschten Nebeneffekten führen. Bei einer Therapie mit Ipilimumab kann es zum Beispiel zur Induktion von Autoimmunerkrankungen kommen, da nicht nur die immunsupprimierenden Mechanismen der Tumorzellen beeinträchtigt werden, sondern auch Mechanismen, die den Körper normalerweise vor Autoimmunangriffen schützen [114, 176].

Ein weiteres Problem der antigenspezifischen Immuntherapie mit Antikörper ist die große Heterogenität und genetische Variabilität innerhalb des Tumors. Durch den evolutionären Druck einer Immun- oder Chemotherapie können Zellklone Wachstumsvorteile erlangen, die nicht mehr die entsprechenden Antigene exprimieren. Diese Prozesse des *immunediting* oder *antigen loss* beschreiben das Phänomen, dass es zu einer klonalen Selektion und zu ungehindertem Wachstum von Tumorzellen kommt, welche das targetierte Antigen nicht oder nur vermindert exprimieren [28, 114].

Zusätzlich ist die Gewebepenetration von Antikörpern ein limitierender Faktor bei der Tumorthherapie. In murinen Tiermodellen zeigte sich, dass nur ca. 20 % der applizierten Antikörpermenge tatsächlich am Tumor ankommt [177]. Da es sich bei Antikörpern um große Moleküle von ca. 150 kDa handelt, sind sie zu groß um über die Niere ausgeschieden zu werden. Die Größe erschwert jedoch deutlich die Gewebepenetration. Besonders bei soliden Tumoren ist deshalb die Wirkung von Antikörpern limitiert [119]. Um dieses Problem zu umgehen können Antikörper strukturell verändert werden. Antikörperfragmente, wie beispielsweise Fab-Fragmente, können aufgrund ihrer verringerten Größe Gewebe leichter penetrieren und besitzen trotzdem dieselbe Bindeaffinität wie das ganze Antikörpermolekül. Obwohl Fab-Fragmente aufgrund des fehlenden Fc-Teils keine Effektorfunktionen vermitteln können, ist die Wirksamkeit durch Binden der tumorspezifischen Antigene nicht eingeschränkt. Durch die bessere Gewebepenetration bieten sich Fab-Fragmente zudem besonders für die Radioimmuntherapie oder zu Bildgebung an. Aufgrund der geringeren Größe ist zwar die Ausscheidungsrate über die Niere gesteigert und damit die Plasmahalbwertszeit verringert, dies führt jedoch bei der Bildgebung zu vermindertem Hintergrund und durch die schnellere Gewebepenetration bei der Radioimmuntherapie zu verringerter Bestrahlung gesunden Gewebes [119].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die getesteten Antikörper neue Möglichkeiten in der Tumorthherapie darstellen. Die präklinischen Analysen dieser Arbeit zeigen, dass sowohl 6A10, als auch 22E6 einen wichtigen Beitrag zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen leisten könnten.

## 9 Anhang

### 9.1 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, B.B., Klaus Kraywinkel, ENno Nowossadeck, Ina Schönfeld, Anne Starker, Antje Wienecke, Ute Wolf, *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland*, Z.f.K.i. Robert-Koch-Institut, Editor. 2016.
2. Greaves, M. and C.C. Maley, *Clonal evolution in cancer*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 306-13.
3. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
4. Gillies, R.J., D. Verduzco, and R.A. Gatenby, *Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(7): p. 487-93.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
7. Deshpande, A., P. Sicinski, and P.W. Hinds, *Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2909-15.
8. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
9. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
10. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 789-91.
11. Zumsteg, A. and G. Christofori, *Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(1): p. 60-70.
12. Patenaude, A., J. Parker, and A. Karsan, *Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 217-23.
13. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
14. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
15. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**: p. 1029-1033.



16. J.M. Berg, J.L.T., L. Stryer, *Stryer Biochemie*. Vol. 6. 2007: Spektrum Akademischer Verlag.
17. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-9.
18. Chiche, J., M.C. Brahimi-Horn, and J. Pouyssegur, *Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): p. 771-94.
19. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
20. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
21. Lindner, D. and D. Raghavan, *Intra-tumoural extra-cellular pH: a useful parameter of response to chemotherapy in syngeneic tumour lines*. Br J Cancer, 2009. **100**(8): p. 1287-91.
22. Semenza, G.L., *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(1): p. 51-6.
23. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
24. Roos, A. and W.F. Boron, *Intracellular pH*. Physiol Rev, 1981. **61**(2): p. 296-434.
25. Madhus, I.H., *Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells*. Biochem J, 1988. **250**(1): p. 1-8.
26. Chiche, J., J.E. Ricci, and J. Pouyssegur, *Tumor hypoxia and metabolism -- towards novel anticancer approaches*. Ann Endocrinol (Paris), 2013. **74**(2): p. 111-4.
27. Spugnini, E.P., et al., *Proton channels and exchangers in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2715-26.
28. Doyen, J., et al., *Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 199.
29. Stock, C. and A. Schwab, *Protons make tumor cells move like clockwork*. Pflugers Arch, 2009. **458**(5): p. 981-92.
30. Silva, A.S., et al., *The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2677-84.
31. Lardner, A., *The effects of extracellular pH on immune function*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 522-30.
32. von Schwarzenberg, K., et al., *V-ATPase inhibition overcomes trastuzumab resistance in breast cancer*. Mol Oncol, 2014. **8**(1): p. 9-19.

33. You, H., et al., *Small interfering RNA targeting the subunit ATP6L of proton pump V-ATPase overcomes chemoresistance of breast cancer cells*. Cancer Lett, 2009. **280**(1): p. 110-9.
34. Supuran, C.T., *Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism*. World J Clin Oncol, 2012. **3**(7): p. 98-103.
35. Supuran, C.T., *Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(2): p. 168-81.
36. Kivela, A.J., et al., *Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor and tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII in normal and neoplastic colorectal mucosa*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(17): p. 2616-25.
37. Raval, R.R., et al., *Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5675-86.
38. Ihnatko, R., et al., *Extracellular acidosis elevates carbonic anhydrase IX in human glioblastoma cells via transcriptional modulation that does not depend on hypoxia*. Int J Oncol, 2006. **29**(4): p. 1025-33.
39. Rafajova, M., et al., *Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells*. Int J Oncol, 2004. **24**(4): p. 995-1004.
40. Svastova, E., et al., *Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH*. FEBS Lett, 2004. **577**(3): p. 439-45.
41. Pastorekova, S., et al., *Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts*. Gastroenterology, 1997. **112**(2): p. 398-408.
42. Niemela, A.M., et al., *Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(9): p. 1760-6.
43. Hynninen, P., et al., *Expression of transmembrane carbonic anhydrases IX and XII in ovarian tumours*. Histopathology, 2006. **49**(6): p. 594-602.
44. Juhasz, M., et al., *Expression of carbonic anhydrase IX in human pancreatic cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(8): p. 837-46.
45. Chia, S.K., et al., *Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3660-8.
46. Perez-Sayans, M., et al., *The use of CA-IX as a diagnostic method for oral leukoplakia*. Biotech Histochem, 2015. **90**(2): p. 124-31.

47. Perez-Sayans, M., et al., *Expression of CA IX in dysplasia adjacent to surgical resection margins of oral squamous cell carcinoma*. Biotech Histochem, 2014. **89**(2): p. 91-7.
48. McDonald, P.C., et al., *Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics*. Oncotarget, 2012. **3**(1): p. 84-97.
49. Hussain, S.A., et al., *Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer*. Br J Cancer, 2007. **96**(1): p. 104-9.
50. Perez-Sayans, M., et al., *Expression of CA-IX is associated with advanced stage tumors and poor survival in oral squamous cell carcinoma patients*. J Oral Pathol Med, 2012. **41**(9): p. 667-74.
51. Robertson, N., C. Potter, and A.L. Harris, *Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6160-5.
52. Wykoff, C.C., et al., *Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7075-83.
53. Barnett, D.H., et al., *Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3505-15.
54. Dekaminaviciute, D., et al., *Monoclonal antibodies raised against 167-180 aa sequence of human carbonic anhydrase XII inhibit its enzymatic activity*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2014. **29**(6): p. 804-10.
55. Dekaminaviciute, D., et al., *Development and characterization of new monoclonal antibodies against human recombinant CA XII*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 309307.
56. Hsieh, M.J., et al., *Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway*. Eur J Cell Biol, 2010. **89**(8): p. 598-606.
57. Proescholdt, M.A., et al., *Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors*. Neuro Oncol, 2005. **7**(4): p. 465-75.
58. Gondi, G., et al., *Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII*. Cancer Res, 2013. **73**(21): p. 6494-503.
59. Battke, C., et al., *Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(5): p. 649-58.
60. Sarkadi, B., et al., *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system*. Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1179-236.
61. Linton, K.J., *Structure and function of ABC transporters*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 122-30.

62. Kopecka, J., et al., *Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells*. Oncotarget, 2015.
63. Kopecka, J., et al., *P-glycoprotein-mediated chemoresistance is reversed by carbonic anhydrase XII inhibitors*. Oncotarget, 2016. **7**(52): p. 85861-85875.
64. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal-redux*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(1): p. 1-11.
65. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
66. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
67. Cui, Y. and G. Guo, *Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(11).
68. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(2): p. 309-16.
69. Chaudhary, B. and E. Elkord, *Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(3).
70. Lindau, D., et al., *The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells*. Immunology, 2013. **138**(2): p. 105-15.
71. Sayour, E.J., et al., *Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(4): p. 419-27.
72. Rasku, M.A., et al., *Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 12.
73. Knapp, K., et al., *Crystal Structure of the Human Ecto-5' -Nucleotidase (CD73): Insights into the Regulation of Purinergic Signaling*. Structure, 2012. **20**(12): p. 2161-2173.
74. Antonioli, L., et al., *Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 842-57.
75. Antonioli, L., et al., *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends Mol Med, 2013. **19**(6): p. 355-67.
76. Heuts, D.P., et al., *Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity*. Chembiochem, 2012. **13**(16): p. 2384-91.
77. Antonioli, L., et al., *Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities*. Trends Cancer, 2016. **2**(2): p. 95-109.

78. Zhang, B., *CD73: a novel target for cancer immunotherapy*. Cancer Res, 2010. **70**(16): p. 6407-11.
79. Colgan, S.P., et al., *Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73)*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 351-60.
80. Blay, J., T.D. White, and D.W. Hoskin, *The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine*. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2602-5.
81. Loi, S., et al., *CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. 11091-6.
82. Ren, Z.H., et al., *CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC*. Oncotarget, 2016. **7**(38): p. 61690-61702.
83. Gaudreau, P.O., et al., *CD73-adenosine reduces immune responses and survival in ovarian cancer patients*. Oncoimmunology, 2016. **5**(5): p. e1127496.
84. Turcotte, M., et al., *CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer*. Cancer Res, 2015. **75**(21): p. 4494-503.
85. Quezada, C., et al., *5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells*. J Cell Physiol, 2013. **228**(3): p. 602-8.
86. Serra, S., et al., *CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death*. Blood, 2011. **118**(23): p. 6141-52.
87. Wang, L., et al., *Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(3): p. 365-72.
88. Zhang, B., *CD73 promotes tumor growth and metastasis*. Oncoimmunology, 2012. **1**(1): p. 67-70.
89. Allard, B., et al., *Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis*. Int J Cancer, 2014. **134**(6): p. 1466-73.
90. Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Strater, *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 437-502.
91. Ryzhov, S., et al., *Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth*. Neoplasia, 2008. **10**(9): p. 987-95.
92. Leibovich, S.J., et al., *Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin*. Am J Pathol, 2002. **160**(6): p. 2231-44.
93. Biswas, S.K., A. Sica, and C.E. Lewis, *Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2011-7.

94. Novitskiy, S.V., et al., *Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1822-31.
95. Cekic, C., et al., *Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 198-205.
96. Ryzhov, S., et al., *Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 6120-9.
97. Stagg, J., et al., *Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1547-52.
98. Allard, B., M. Turcotte, and J. Stagg, *Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2014. **18**(8): p. 863-81.
99. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
100. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
101. van der Pol, E., et al., *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 676-705.
102. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-79.
103. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
104. Vlassov, A.V., et al., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(7): p. 940-8.
105. Bobrie, A., et al., *Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression*. Cancer Res, 2012. **72**(19): p. 4920-30.
106. Filipazzi, P., et al., *Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(4): p. 342-9.
107. Clayton, A., et al., *Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 676-83.
108. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 883-91.
109. Luga, V., et al., *Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration*. Cell, 2012. **151**(7): p. 1542-56.

110. Al-Nedawi, K., et al., *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3794-9.
111. Bebawy, M., et al., *Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells*. Leukemia, 2009. **23**(9): p. 1643-9.
112. Becker, A., et al., *Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis*. Cancer Cell, 2016. **30**(6): p. 836-848.
113. Wolfers, J., et al., *Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 297-303.
114. Monjazebe, A.M., et al., *Immunoediting and antigen loss: overcoming the achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 197.
115. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
116. Winter, G. and C. Milstein, *Man-made antibodies*. Nature, 1991. **349**(6307): p. 293-9.
117. Neuberger, M.S., et al., *A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function*. Nature, 1985. **314**(6008): p. 268-70.
118. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**(6069): p. 522-5.
119. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(2): p. 220-33.
120. Roopenian, D.C. and S. Akilesh, *FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 715-25.
121. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Antibodies, Fc receptors and cancer*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 239-45.
122. Shinkawa, T., et al., *The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3466-73.
123. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 278-87.
124. Verma, S., et al., *Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **367**(19): p. 1783-91.
125. Friedberg, J.W. and R.I. Fisher, *Iodine-131 tositumomab (Bexxar): radioimmunoconjugate therapy for indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Expert Rev Anticancer Ther, 2004. **4**(1): p. 18-26.

126. Dragovic, R.A., et al., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine, 2011. **7**(6): p. 780-8.
127. Gardiner, C., et al., *Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis*. J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
128. Kopecka, J., et al., *Insights in the chemical components of liposomes responsible for P-glycoprotein inhibition*. Nanomedicine, 2014. **10**(1): p. 77-87.
129. Serra, S. and S. Deaglio, *HPLC-based Assay to Monitor Extracellular Nucleotide/Nucleoside Metabolism in Human Chronic Lymphocytic Leukemia Cells*. J Vis Exp, 2016(113).
130. Erturk, A., et al., *Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO*. Nat Protoc, 2012. **7**(11): p. 1983-95.
131. Erturk, A. and F. Bradke, *High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO)*. Exp Neurol, 2013. **242**: p. 57-64.
132. Erturk, A., D. Lafkas, and C. Chalouni, *Imaging cleared intact biological systems at a cellular level by 3DISCO*. J Vis Exp, 2014(89).
133. Pan, C., et al., *Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO*. Nat Methods, 2016. **13**(10): p. 859-67.
134. Chiche, J., et al., *Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 358-68.
135. Murri-Plesko, M.T., et al., *Antibody inhibiting enzymatic activity of tumour-associated carbonic anhydrase isoform IX*. Eur J Pharmacol, 2011. **657**(1-3): p. 173-83.
136. Vick, B., et al., *An advanced preclinical mouse model for acute myeloid leukemia using patients' cells of various genetic subgroups and in vivo bioluminescence imaging*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120925.
137. Minn, A.J., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. Nature, 2005. **436**(7050): p. 518-24.
138. Cailleau, R., M. Olive, and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. In Vitro, 1978. **14**(11): p. 911-5.
139. Scrideli, C.A., et al., *Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR*. J Neurooncol, 2008. **88**(3): p. 281-91.
140. Kleizen, B. and I. Braakman, *Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 343-9.



141. Stagg, J. and M.J. Smyth, *Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer*. Oncogene, 2010. **29**(39): p. 5346-58.
142. Mikhailov, A., et al., *CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 464-75.
143. Hertlein, E., et al., *Characterization of a new chronic lymphocytic leukemia cell line for mechanistic in vitro and in vivo studies relevant to disease*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76607.
144. Greening, D.W., et al., *A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods*. Methods Mol Biol, 2015. **1295**: p. 179-209.
145. Tauro, B.J., et al., *Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes*. Methods, 2012. **56**(2): p. 293-304.
146. Vullo, D., et al., *Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(6): p. 1005-9.
147. Dubois, L., et al., *Targeting carbonic anhydrase IX by nitroimidazole based sulfamides enhances the therapeutic effect of tumor irradiation: a new concept of dual targeting drugs*. Radiother Oncol, 2013. **108**(3): p. 523-8.
148. Dubois, L., et al., *Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation*. Radiother Oncol, 2011. **99**(3): p. 424-31.
149. Wilkinson, B.L., et al., *A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by "click-tailing"*. J Med Chem, 2006. **49**(22): p. 6539-48.
150. Zatovicova, M., et al., *Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(29): p. 3255-63.
151. Amin, M.L., *P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery*. Drug Target Insights, 2013. **7**: p. 27-34.
152. Thomas, H. and H.M. Coley, *Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein*. Cancer Control, 2003. **10**(2): p. 159-65.
153. Pusztai, L., et al., *Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma*. Cancer, 2005. **104**(4): p. 682-91.
154. Demuth, T. and M.E. Berens, *Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion*. J Neurooncol, 2004. **70**(2): p. 217-28.

155. Dickerman, R.D. and M.B. Eisenberg, *Preassembled method for insertion of Ommaya reservoir*. J Surg Oncol, 2005. **89**(1): p. 36-8.
156. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
157. Hay, C.M., et al., *Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447*. Oncoimmunology, 2016. **5**(8): p. e1208875.
158. Bhattarai, S., et al., *alpha,beta-Methylene-ADP (AOPCP) Derivatives and Analogues: Development of Potent and Selective ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors*. J Med Chem, 2015. **58**(15): p. 6248-63.
159. Terp, M.G., et al., *Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells*. J Immunol, 2013. **191**(8): p. 4165-73.
160. Geoghegan, J.C., et al., *Inhibition of CD73 AMP hydrolysis by a therapeutic antibody with a dual, non-competitive mechanism of action*. MAbs, 2016. **8**(3): p. 454-67.
161. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
162. Iannone, R., et al., *Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model*. Am J Cancer Res, 2014. **4**(2): p. 172-81.
163. Allard, B., et al., *Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(20): p. 5626-35.
164. Shiuan, E., et al., *Thrombocytopenia in patients with melanoma receiving immune checkpoint inhibitor therapy*. J Immunother Cancer, 2017. **5**: p. 8.
165. Whiteside, T.L., *Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Tumor-Induced Immune Suppression*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
166. Whiteside, T.L., *Exosomes and tumor-mediated immune suppression*. J Clin Invest, 2016. **126**(4): p. 1216-23.
167. Lobb, R.J., L.G. Lima, and A. Moller, *Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **67**: p. 3-10.
168. Schuler, P.J., et al., *Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells*. Clin Exp Immunol, 2014. **177**(2): p. 531-43.
169. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2527-35.
170. Descot, A. and T. Oskarsson, *The molecular composition of the metastatic niche*. Exp Cell Res, 2013. **319**(11): p. 1679-86.

- 
171. Liu, Y. and X. Cao, *Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche*. Cancer Cell, 2016. **30**(5): p. 668-681.
  172. Hart, M.L., et al., *Direct treatment of mouse or human blood with soluble 5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(8): p. 1477-83.
  173. Grenz, A., et al., *Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 833-45.
  174. Eckle, T., et al., *Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8127-37.
  175. Maksimow, M., et al., *Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis\**. Crit Care Med, 2014. **42**(12): p. 2556-64.
  176. Di Giacomo, A.M., M. Biagioli, and M. Maio, *The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications*. Semin Oncol, 2010. **37**(5): p. 499-507.
  177. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 170-9.

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APCP	Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylen)diphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Carboanhydrase
ca.	Zirka
CCL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxirubonukleinsäure
Doxo	Doxorubicin
DPBS	Dulbecco's Phosphat buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii / et aliae / et alia – und andere
EV	Extrazelluläre Vesikel
FCS	Fötales Kälberserum
flUC	<i>Firefly</i> Luziferase
FSC	Vorwärtsstreulicht
GFP	Grün floureszierendes Protein
h	<i>Hour</i> (Stunde)
H&E	Hämalaun & Eosin

---

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<i>i.v.</i>	Intravenös
IL-10	Interleukin-10
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTA	Nanopartikel Tracking-Analyse
P-GP	P-Glykoprotein
PD-1	<i>Programmed cell death</i> Protein 1
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
SSC	Seitwärtsstreulicht
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

### 9.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei einigen Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an Prof. Dr. Reinhard Zeidler für die beiden interessanten Projekte und die tolle wissenschaftliche Betreuung. Danke für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Josef Mautner für die offizielle Vertretung dieser Arbeit an der biologischen Fakultät, aber auch für Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Bereitschaft die Zweitkorrektur meiner Dissertation zu übernehmen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und Dr. Andreas Moosmann für die Beratung bei Fragen und Problemen bedanken.

Mein großer Dank geht an Judith Dünzkofer, die mich praktisch in vielen Dingen sehr unterstützte, viele, viele Vesikel isolierte und mit ihrer offenen, bayerischen Art immer für gute Laune sorgte.

Danke auch besonders an Corinna Hüls, dafür, dass wir bei so vielen Dingen im Labor immer einer Meinung waren und gemeinsam versuchten Ordnung zu halten. Vielen Dank an Dr. Kathrin Gärtner und an Schörlinger für die lustige Zeit im Labor. Ich möchte mich des Weiteren bei allen anderen Laborkollegen des Labors 205 und der AGV für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Hiermit möchte ich mich außerdem bei Dr. Gabor Gondi für die Unterstützung und Zusammenarbeit bei den Tierexperimenten bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht dabei auch an alle Tierpfleger, die mich in der Haltung und Versorgung der Versuchstiere toll unterstützten.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe „Monoklonale Antikörper Core Facility“ des Helmholtz-Zentrums München für die Immunisierungen, die Hybridomzellkultur sowie die Reinigung der vielen Antikörper. Danke besonders an Andrew, der immer ein offenes Ohr hatte und trotz vieler Runden an FACS-Tests nie die Hoffnung auf einen stabilen Produzentenklon aufgab.

Vielen Dank an Dr. Chiara Riganti für den schönen Forschungsaufenthalt in Turin und die tolle Kooperation. Danke auch an die Kooperationspartner Dr. Diaglio von der Universität Turin, an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Glaß der Neurochirurgischen Forschung am Klinikum der Universität München und an die Arbeitsgruppe von Dr. Ali Ertürk des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung der LMU.

Dr. Martina Pugo Braun und Dr. Simmi Brändle danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber auch für die emotionale Unterstützung und den gelegentlichen Zwischensekt, der immer wieder zu neuen Motivationsschüben führte.

Zu guter Letzt gilt mein großer Dank meiner Familie, meinem Verlobten Matze und Dr. Naaag für die bedingungslose Unterstützung, besonders in schwierigen und anstrengenden Zeiten während der Promotion. Vielen Dank!